



# Λάρισα 2018

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
Τοξικολογία

**[ ΗΛΕΚΤΡΑ ΜΑΡΑΓΚΟΥ ]**

ΓΕΩΠΟΝΟΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ Γ.Π.Α

**Assessment of the antioxidant capacity of sheep milk from little farms**

**Προσδιορισμός αντιοξειδωτικής δράσης στο πρόβειο γάλα από μικρές φάρμες**

### **Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή**

**Δημήτριος Στάγκος (Επιβλέπων):** Επίκουρος Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Δημήτριος Κουρέτας:** Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Μανούρας Αθανάσιος :** Καθηγητής του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων, Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Τ.Ε.Ι Θεσσαλίας

*Στην οικογένειά μου*

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου **κ. Στάγκο Δημήτριο** για τον προσανατολισμό και τη στήριξη που μου παρείχε στη διάρκεια εκπόνησης της παρούσης μελέτης.

Τις ευχαριστίες μου να απευθύνω στον καθηγητή Τοξικολογίας – Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών και υπεύθυνο του μεταπτυχιακού προγράμματος «Τοξικολογία», **κ.Κουρέτα Δημήτριο** για την ενσωμάτωση του παρόντος στην αρμοδιότητά του καθώς και για την επιστημονική ευρύτητα την οποία μας εμφυσά.

Την μεταδιδακτορική ερευνήτρια και υπεύθυνη του εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών **κ.Κερασιώτη Θάλεια** ,ευχαριστώ θερμά τόσο για την επιμέλεια οργάνωσης του εργαστηριακού μέρους της μελέτης όσο και για την ολοκλήρωση των εργασιών.

Τέλος, να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του Τ.Ε.Ι Θεσσαλίας **κ.Μανούρα Αθανάσιο** για την παραχώρηση εξοπλισμού του χημικού εργαστηρίου του στη διεκπεραίωση των απαιτούμενων αναλύσεων.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το πρόβειο γάλα αποτελεί προϊόν υψηλής θρεπτικής αξίας και υψηλής συγκέντρωσης πρωτεϊνών, λιπιδίων, μετάλλων και βιταμινών συγκρινόμενο με το γάλα άλλων θηλαστικών που το τοποθετούν σε πλεονεκτική θέση ως πιθανό λειτουργικό τρόφιμο ή ως μήτρα για την ανάπτυξη λειτουργικών γαλακτοκομικών προϊόντων.

Στην παρούσα πτυχιακή διατριβή μελετήθηκε η ικανότητα εξουδετέρωσης πρόβειου γάλακτος της ρίζας DPPH\* από 5 συνολικά μικρές φάρμες του νομού Τρικάλων. Η περίοδος δειγματοληψίας πραγματοποιήθηκε από 1η έως 31η Μαρτίου του έτους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εξεταζόμενο γάλα και των 5 φαρμών εμφάνισε ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα DPPH\*. Για κάθε φάρμα προσδιορίστηκε η τιμή  $IC_{50}$ , η ποσότητα του γάλακτος που έχει την ικανότητα να αναστέλλει τη ρίζα κατά 50%. Όσο μικρότερη είναι η τιμή  $IC_{50}$  τόσο μεγαλύτερη είναι και η ικανότητα αναστολής της ρίζας για το εκάστοτε γάλα. Οι τιμές  $IC_{50}$  για τις φάρμες 1, 2, 3, 4, 5 είναι 158.7  $\mu$ l, 125.3  $\mu$ l, 142.8  $\mu$ l, 104.7  $\mu$ l και 112.3  $\mu$ l, αντίστοιχα. Το γάλα της φάρμας 4 εμφάνισε τη μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης σε σχέση με τις υπολοιπες φάρμες καθώς έχει τη μικρότερη τιμή  $IC_{50}$  ( $IC_{50}$ = 104.7  $\mu$ l).

## **Abstract**

Sheep milk is a product of high nutritional value with high concentration of proteins, lipids, minerals and vitamins compared to other mammals' milk that places it in an advantageous position as a potential functional food or as a matrix for the development of functional dairy products.

In the present study, the antioxidant capacity of sheep milk from 5 small farms from the Prefecture of Trikala was studied. The sampling period took place from 1 to 31 March of the year. The results showed that the tested milk of all 5 farms had a scavenging ability against the DPPH radical. For each farm the IC<sub>50</sub> value was determined, that is, the amount of milk having the ability to inhibit the radical by 50%. The lower the IC<sub>50</sub> value, the greater the ability to inhibit the radical. The IC<sub>50</sub> values for farms 1, 2, 3, 4, 5 were 158.7 µl, 125.3 µl, 142.8 µl, 104.7 µl and 112.3 µl, respectively. The milk from farm 4 exhibited the greatest free radical capacity compared to the other farms, as it has the lowest IC<sub>50</sub> value (IC<sub>50</sub> = 104.7 µl).

## **ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ**

### **1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

1.1. ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ

1.2 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS)

1.2.1 ΑΝΙΟΝ ΣΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ( $O_2^{\bullet-}$ )

1.2.2 ΡΙΖΑ ΥΔΡΟΞΥΛΙΟΥ ( $OH^{\bullet}$ )

1.2.3 ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ( $H_2O_2$ )

1.3 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ (RNS)

1.4 ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ROS

1.4.1 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ

1.4.2 ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ “ΕΚΡΗΞΗ”

1.4.3. ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΤΗΣ ΞΑΝΘΙΝΗΣ

1.4.5 ΚΥΤΟΧΡΩΜΑ P450

1.4.6 ΑΥΤΟΟΞΕΙΔΩΣΗ ΜΟΡΙΩΝ

1.5 ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ROS

1.6 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ROS

1.6.1 ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

1.6.2 ΕΠΙΒΛΑΒΕΙΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

1.7 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

1.8 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

1.8.1 ΕΝΖΥΜΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ



1.8.1.α ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΚΗ ΔΙΣΜΟΥΤΑΣΗ (SOD)

1.8.1.β. ΚΑΤΑΛΑΣΗ (CAT)

1.8.2 ΜΗ ENZYMΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

1.8.2.α. Βιταμίνη Ε (τοκοφερόλη)

1.8.2.β. Βιταμίνη C

1.8.2.γ. Β-καροτένιο και βιταμίνη Α (ρετινόλη)

1.8.2.δ. Φλαβονοειδή

1.8.2.ε. Γλουταθειόνη (GSH)

1.8.2.στ. Συνένζυμο Q10

1.8.2.ζ. Ουρικό οξύ

1.8.2.η. Χολερυθρίνη

## **2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΕΞΟΥΔΕΤΕΡΩΣΗ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ**

2.1 Πρόβειο γάλα

2.1.1 Χαρακτηριστικά πρόβειου γάλακτος και φυσικοχημικές ιδιότητες

2.1.2 Αντιοξειδωτικά και βιοενεργά μόρια πρόβειου γάλακτος

## **3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

3.1 Υλικά

3.2 Αρχή μεθόδου- Εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH•

## **4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

4.1 Αναστολή ρίζας DPPH•

## **5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

## **6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.1 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ**

Με τον όρο ‘‘ελεύθερες ρίζες’’ αναφερόμαστε σε μόρια ή άτομα με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα σθένους (Cheeseman & Slater 1993). Για παράδειγμα ελεύθερες ρίζες σχηματίζονται όταν διασπάται ένας ομοιοπολικός δεσμός και ένα ηλεκτρόνιο παραμένει με κάθε νεοσχηματισμένη χημική οντότητα. Η πιο απλή ελεύθερη ρίζα είναι το άτομο του υδρογόνου που αποτελείται από ένα πρωτόνιο και ένα ηλεκτρόνιο. Οι ελεύθερες ρίζες είναι μόρια πολύ ασταθή και πολύ δραστικά καθώς προσπαθούν να αποσπάσουν ηλεκτρόνια από άλλα μόρια (Keles et al. 2001; Prior & Cao 1999).

Ο χρόνος ημιζωής τους είναι πολύ μικρός (κυμαίνεται από χιλιοστά του δευτερολέπτου έως νανοδευτερόλεπτα). Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται από μια μεταφορά ηλεκτρονίου που απαιτεί υψηλή κατανάλωση ενέργειας (Cheeseman & Slater 1993).

Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδρούν είτε μεταξύ τους είτε με διάφορα άλλα μόρια τα οποία δεν είναι ρίζες. Όταν αντιδρούν μεταξύ τους οδηγούν στην παραγωγή μιας μη ρίζας. Η μη ρίζα αυτή συνήθως είναι λιγότερο δραστική από εκείνες που οδήγησαν στην παραγωγή της. Όταν οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με μία μη ρίζα, όπως είναι τα περισσότερα βιομόρια (DNA, λιπίδια, πρωτεΐνες), παράγονται νέες ρίζες οι οποίες στην συνέχεια μπορούν να αντιδράσουν με άλλα μόρια και να οδηγήσουν στην παραγωγή νέων ριζών. Η διαδικασία αυτή μπορεί να συνεχιστεί αλυσιδωτά με δυσμενείς συνέπειες για τον οργανισμό. (K. Cheeseman & Slater, 1993; Halliwell&Gutteridge 1998; Halliwell, 2001).

Υπάρχουν διάφοροι τύποι ελεύθερων ριζών. Οι πλέον σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι μοριακά είδη με κέντρο το οξυγόνο και μερικές φορές το άζωτο (Sengupta et al. 2004; AICR 2007; Pani et al. 2010) ή το θείο (Battin & Brumaghim 2009; Pani et al. 2010).

### **1.2 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ (ROS)**

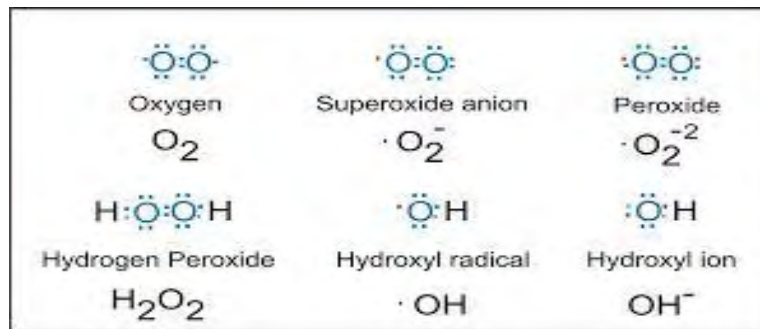
Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου συνήθως περιγράφει τις ελεύθερες ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το οξυγόνο. Ωστόσο, δεν αποτελούν όλες οι ROS ελεύθερες ρίζες. Οι ευεργετικές δράσεις των ROS παρατηρούνται σε χαμηλές ή μέτριες συγκεντρώσεις και αφορούν σε φυσιολογικές διαδικασίες όπως στην κυτταρική απόκριση στο στρες, στη μεταγωγή σήματος, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στη μεταγραφή γονιδίων, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη φλεγμονή, στην απόπτωση, στη φαγοκυττάρωση κυττάρων του ανοσοποιητικού και στη σηματοδότηση για την πήξη του αίματος (Παπαγαλάνης 2014).

Όλες οι ROS έχουν κοινή ικανότητα να αποσπών ένα ηλεκτρόνιο από ένα μόριο στόχο και αυτό χημικά ονομάζεται οξείδωση. Επομένως, οι ROS προκαλούν οξείδωση και γι'αυτό δρουν ως οξειδωτικά, ενώ οι ίδιες υφίστανται αναγωγή. Αποτελούνται από τα ενδιάμεσα προϊόντα ατελούς αναγωγής του οξυγόνου.

Χαρακτηριστικά παραδείγματα τέτοιων ελευθέρων ριζών είναι η ρίζα του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ), του υδροξυλίου ( $OH^{\cdot}$ ), του αλκοξυλίου ( $RO^{\cdot}$ ) και του υδροπεροξυλίου ( $HO_2^{\cdot}$ ). Ωστόσο, στις ROS εντάσσονται και μη ριζικά παράγωγα του οξυγόνου όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), το υποχλωριώδες οξύ ( $HOCl$ ), το υποβρωμιώδες οξύ ( $HOBr$ ) και το όζον  $O_3$ .

Πίνακας 1: Δραστικές μορφές Οξυγόνου

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ	
Radicals	Non-radicals
Ανιόν Σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ )	Υπεροξείδιο Υδρογόνου ( $H_2O_2$ )
Ρίζα Υδροξυλίου ( $OH^{\cdot}$ )	Υποχλωριώδες Οξύ ( $HOCl$ )
Ρίζα Υπεροξειδίου ( $RO_2^{\cdot}$ )	Υποβρωμιώδες Οξύ ( $HOBr$ )
Ρίζα Αλκοξειδίου ( $RO^{\cdot}$ )	Όζον ( $O_3$ )
Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου ( $HO_2^{\cdot}$ )	Μονήρες Οξυγόνο ( $^1O_2$ )

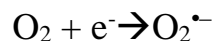


Εικόνα 1: Παραδείγματα δραστικών μορφών οξυγόνου

### 1.2.1 ANION ΣΟΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟΥ ( $O_2^{\cdot-}$ )

Το σουπεροξειδίο αρχικά σχηματίζεται σαν ένα ενδιάμεσο βιοχημικών αντιδράσεων (Halliwell 1995). Αυτό το ανιόν είναι αρνητικά φορτισμένο και είναι σχετικά αδιαπέραστο στη μεμβράνη.

Το ανιόν του σουπεροξειδίου σχηματίζεται από την οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταξύ του μοριακού οξυγόνου και ενός ηλεκτρονίου.



Στα φαγοκύτταρα παράγεται σε μεγάλες ποσότητες από την οξειδάση NADPH και χρησιμοποιείται στους εξαρτώμενους από οξυγόνο μηχανισμούς εξουδετέρωσης εισβαλόντων παθογόνων επειδή είναι ιδιαίτερα τοξικό (Halliwell 1995). Παράγεται επίσης ως παραπροϊόν της αναπνοής που πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια, και κυρίως από τα συμπλέγματα I και II. Παράγεται ακόμα και από άλλα ένζυμα, όπως η οξειδάση της ξανθίνης, κατά τη μετατροπή της υποξανθίνης σε ξανθίνη και εκείνης σε ουρικό οξύ (Muller et al. 2007).

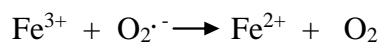
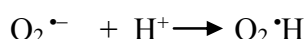
### 1.2.2 ΡΙΖΑ ΥΔΡΟΞΥΛΙΟΥ ( $OH^{\cdot}$ )

Πρόκειται για μια πολύ δραστική ρίζα που, ωστόσο, παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη χημεία των ριζών (Hayyan et al. 2016).

Η ρίζα υδροξυλίου συχνά παράγεται σαν παραπροϊόν της δράσης του ανοσοποιητικού και μπορεί να δράσει ενάντια σε όλα σχεδόν τα είδη μακρομορίων: υδατάνθρακες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια και αμινοξέα (Reiter et al. 1995). Ο χρόνος ημιζωής της ρίζας υδροξυλίου *in vivo* είναι πολύ μικρός και για το λόγο αυτό είναι πολύ επικίνδυνη για τον οργανισμό (Reiter et al. 1997; Reiter et al. 1995). Σε αντίθεση με το ανιόν του σουπεροξειδίου το οποίο μπορεί να εξουδετερωθεί από την

υπεροξειδική δισμουτάση, η ρίζα υδροξυλίου δεν μπορεί να αποτοξικοποιηθεί μέσω ενζυμικής αντίδρασης. Έτσι το κύτταρο επιστρατεύει άλλους μηχανισμούς όπως είναι τα ενδογενή αντιοξειδωτικά για να προστατευτεί από την επιβλαβή δράση του (Reiter et al. 1997).

Προκύπτει σύμφωνα με την αντίδραση Fenton-Haber-Weiss μεταξύ του ανιόντος του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης, το οποίο επιταχύνει την αντίδραση. Στα βιολογικά συστήματα το μέταλλο αυτό είναι συνήθως ο σίδηρος (Mylonas & Kouretas 1999).



Ο χαλκός και άλλα μεταλλικά ιόντα μπορούν επίσης να καταλύσουν την αντίδραση. Η ρίζα υδροξυλίου είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που αντιδρά με πολλά οργανικά και ανόργανα μόρια στο κύτταρο (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, αμινοξέα και μέταλλα). Οι τρεις κύριες αντιδράσεις τη ρίζας υδροξυλίου είναι η απόσπαση υδρογόνου, η προσθήκη και η μεταφορά ηλεκτρονίου.

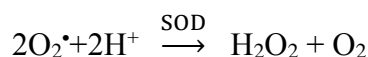
### 1.2.3 ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΥΔΡΟΓΟΝΟΥ ( $H_2O_2$ )

Το υπεροξείδιο του υδρογόνου δεν είναι ελεύθερη ρίζα αλλά προκαλεί βλάβες στο κύτταρο σε μικρές συγκεντρώσεις (10μM). Πρόκειται για ένα δραστικό μόριο, που μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή ελευθέρων ριζών, όπως η ρίζα του υδροξυλίου. Είναι σταθερό, διαπερατό στις μεμβράνες και έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής μέσα στο κύτταρο. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι κυτταροτοξικό αλλά θεωρείται ένας σχετικά ασθενής οξειδωτικός παράγοντας. Η κυτταροτοξικότητά του εμφανίζεται μέσω της ικανότητάς του να παράγει ελεύθερες ρίζες μέσω μεταλλο-καταλυόμενων αντιδράσεων όπως η αντίδραση Fenton.



Το υπεροξείδιο του υδρογόνου σχηματίζεται από οξειδάσες, οι οποίες καταλύουν τη μεταφορά δύο ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο, όπως οι οξειδάσες

των αμινοξέων, η οξειδάση της γλυκόζης και η οξειδάση του γλυκολικού. Σχηματίζεται επίσης με αυτο-οξειδοαναγωγή της ρίζας υπεροξειδίου



### 1.3 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ (RNS)

Στις ελεύθερες ρίζες ανήκουν και κάποιες από τις δραστικές μορφές αζώτου (Reactive Nitrogen Species, RNS). Οι RNS περιλαμβάνουν ρίζες που έχουν σαν κεντρικό μόριο το άζωτο όπως το μονοξειδίο του αζώτου  $\text{NO}^{\bullet}$  και το διοξειδίο του

αζώτου  $\text{NO}_2^{\bullet}$  καθώς και αζωτούχες ενώσεις που δεν είναι ελεύθερες ρίζες αλλά είναι οξειδωτικοί παράγοντες ή μετατρέπονται εύκολα σε ελεύθερες ρίζες (π.χ. το νιτρώδες οξύ  $\text{HNO}_2$  και το ανιόν του νιτρικού υπεροξειδίου  $\text{ONOO}^-$ ) (Fang et al. 2002).

Πίνακας 2: Δραστικές μορφές αζώτου

ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΑΖΩΤΟΥ	
Radicals	Non-radicals
Ρίζα Μονοξειδίου Αζώτου ( $\text{NO}^{\bullet}$ )	Νιτρώδες Οξύ ( $\text{HNO}_2$ )
Ρίζα Διοξειδίου Αζώτου ( $\text{NO}_2^{\bullet}$ )	Κατιόν Νιτροσουλίου ( $\text{NO}^+$ )
	Ανιόν Νιτροσουλίου ( $\text{NO}^-$ )

## 1.4 ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ROS

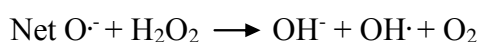
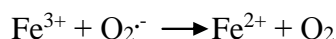
### 1.4.1 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΦΩΣΦΟΡΥΛΙΩΣΗ

Είναι μία διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και θεωρείται ίσως η σημαντικότερη ενδοκυτταρική πηγή ROS. Η πλειοψηφία των ROS παράγεται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια αφού το 0,1-1% του οξυγόνου μετατρέπεται σε ρίζα.

Η αφυδρογονάση του NADH (σύμπλεγμα 1) και το σύμπλεγμα κυτοχρώματος bc1 (σύμπλεγμα 3), είναι γνωστές θέσεις παραγωγής  $\text{O}_2^{\bullet-}$  και  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Chance et al. 1979b). Το  $\text{H}_2\text{O}_2$  δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και  $\text{FADH}_2$  στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (Chance et al. 1979b). Το  $\text{O}_2^{\bullet-}$  ανάγεται σε  $\text{H}_2\text{O}_2$  από τη μιτοχονδριακή δισμουντάση του υπεροξειδίου

(Mn-SOD). Ακόμα, μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο  $O_2^{\cdot-}$  και στο  $H_2O_2$  δημιουργείται  $OH^{\cdot}$ .

#### Αντίδραση Haber-Weiss:



Στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου παράγεται επίσης μονοξειδίο του αζώτου (NO) από την συνθήση του NO. Το μονοξειδίο του αζώτου αντιδρά με το ανιόν σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) και παράγει υπεροξυνιτρικό ανιόν ( $ONOO^-$ ), το οποίο σε φυσιολογικό pH παράγει υπεροξυνιτρώδες οξύ ( $ONOOH$ ). Από αυτό τελικά σχηματίζονται οι ρίζες  $O_2^{\cdot-}$  και  $NO_2^{\cdot}$ .

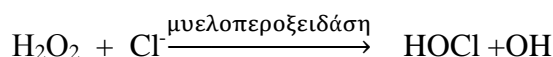
Η αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) με την ουβικινόλη ( $UQH_2$ ) οδηγεί στο σχηματισμό ημικινόνης ( $UQH$ ), η οποία λειτουργεί σαν σημείο παραγωγής σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ).

#### **1.4.2 ΟΥΔΕΤΕΡΟΦΙΛΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΗ “ΕΚΡΗΞΗ”**

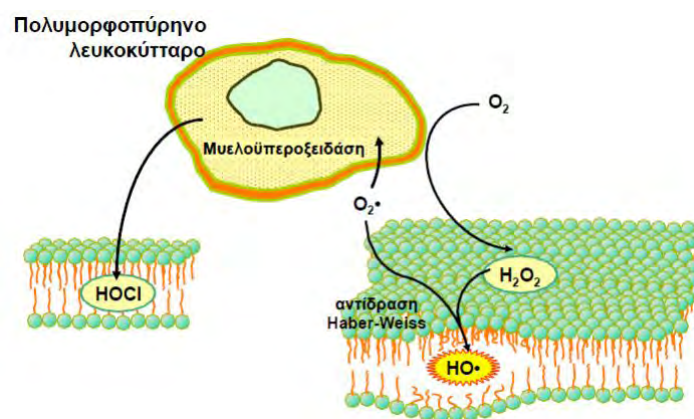
Τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα (PMN) είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού που παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των ιστών από την προσβολή τους από ιούς και βακτήρια (Pyne, 1994). Η ενεργοποίηση των PMN τυπικά αρχίζει με την καταστροφή του ιστού που προκαλείται από ROS ή άλλους μηχανισμούς (MeydaniandEvans, 1979).

Στην οξεία φάση αντίδρασης, τα PMN μεταναστεύουν στην περιοχή τραυματισμού καθώς προσελκύονται από χημειοτακτικούς παράγοντες που προέρχονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα και απελευθερώνουν τα λυτικά ένζυμα καθώς και το  $O_2^{\cdot-}$  κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης.

Τα λυτικά ένζυμα διευκολύνουν την καταστροφή των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβες ενώ το  $O_2^{\cdot-}$  παράγεται από τη μυελοϋπεροξειδάση και την NADPH οξειδάση (Petronet al., 1992). Η κυτταροπλασματική δισμουτάση του υπεροξειδίου μετατρέπει το  $O_2^{\cdot-}$  σε  $H_2O_2$ , το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε  $OH^{\cdot}$  από ιόντα μετάλλων ή σε  $HOCl$ .



Αυτή η φλεγμονώδης αντίδραση θεωρείται σημαντική για την απομάκρυνση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και την παρεμπόδιση βακτηριακής και ιϊκής μόλυνσης, ωστόσο, ROS και άλλα οξειδωτικά μόρια που απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα μπορούν να προκαλέσουν δευτερογενή βλάβη όπως υπεροξείδωση των λιπιδίων (MeydaniandEvans, 1979; Meydanietal., 1992). Η φαγοκυττάρωση βακτηρίων ή ιών, προκαλεί το φαινόμενο που είναι γνωστό και ως αναπνευστική «έκρηξη». Χαρακτηρίζεται από αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου και γλυκόζης από τα κύτταρα και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή σουπεροξειδίου και εν τέλει HOCl όπως είδαμε.



Εικόνα 2: Παραγωγή ελευθέρων ριζών από πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα

### 1.4.3. ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΤΗΣ ΞΑΝΘΙΝΗΣ

Είναι μια φλαβοπρωτεΐνη που καταλύει την οξειδωτική υδροξυλίωση υποστρωμάτων πουρινών στο κέντρο μολυβδαινίου και οδηγεί σε μείωση του  $O_2$  στο κέντρο της φλαβίνης με επακόλουθη παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), είτε ανιόντος σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) ή υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) (BorgesF. Etal., 2002).

### 1.4.5 ΚΥΤΟΧΡΩΜΑ P<sub>450</sub>

Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα μικροσώματα των ηπατικών κυττάρων παράγουν ROS μέσω του κυτοχρώματος P<sub>450</sub> (Yu 1994).

Το NADPH υφίσταται οξείδωση δημιουργώντας  $O_2^{\cdot-}$  το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε  $H_2O_2$  (Chance et al. 1979a). Ο ρυθμός παραγωγής του  $H_2O_2$  είναι ανάλογος με την κατανάλωση οξυγόνου στο μικρόσωμα. Παρουσία ADP και  $Fe^{3+}$



η NADPH οξειδάση καταλύει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NADPH στο  $O_2$  παράγοντας  $O_2^{\bullet-}$ .

#### **1.4.6 ΑΥΤΟΟΞΕΙΔΩΣΗ ΜΟΡΙΩΝ**

Ορισμένα μόρια όπως φλαβίνες, κατεχολαμίνες, θειόλες και η αιμογλοβίνη μπορούν να αυτοοξειδωθούν σχηματίζοντας ανιόν σουπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ).

### **1.5 ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΚΕΣ ΠΗΓΕΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ROS**

Η ηλιακή και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία καθώς και το όζον, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου και τα βιομηχανικά απόβλητα είναι σημαντικοί οξειδωτικοί παράγοντες. Επίσης, ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν από τη δράση ορισμένων φαρμάκων (Naito et al. 1998; Ray et al. 2001) και άλλων ξενοβιοτικών όπως τοξίνες και εντομοκτόνα καθώς ακόμα και από την αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ και την έντονη άσκηση (αερόβια ή αναερόβια) (Elsayed et al. 1992; Jones et al. 2000; Obata et al. 2001). Τέλος, σημαντική πηγή οξειδωτικών είναι και η διατροφή (B. Ames 1986; Kanner & Lapidot 2001; Lijinsky 1999).

### **1.6 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ROS**

#### **1.6.1 ΘΕΤΙΚΕΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ**

Μία ποσότητα ελευθέρων ριζών είναι απαραίτητη για διάφορες σημαντικές βιοχημικές διαδικασίες, όπως έκφραση γονιδίων (Jietal., 2006) και μεταγωγή σήματος (Ji, 2007). Συγκεκριμένα, συμμετέχουν σε αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια, τόσο ένδο- όσο και διακυτταρικά. Παραδείγματος χάριν, έχουν τη δυνατότητα τροποποίησης της δραστηριότητας πρωτεϊνών προκαλώντας το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Οι πρωτεΐνες στόχοι των ROS ανήκουν σε πολλές κατηγορίες όπως φωσφατάσες, MAP κινάσες, μεταγραφικοί παράγοντες και απακετυλάσες η μεθυλάσες ιστονών. Συνεισφέρουν και στο ανοσοποιητικό σύστημα, δρώντας ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκύττωσης (Finaudetal., 2006). Ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με την ανοσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό και την απόπτωση (Reid, 2001; Linnaneetal., 2002).

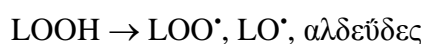
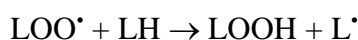
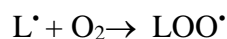
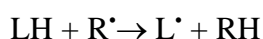
Επίσης, οι ελεύθερες ρίζες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση ενζύμων (Jenkins, 1988), την αποτοξίνωση από φάρμακα καθώς και στη μυϊκή σύσπαση (Linnaneetal., 2002). Συγκεκριμένα, η αναστολή της παραγωγής των ROS μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της συσταλτότητας των μυϊκών ινών ενώ αύξηση των επιπέδων τους επιτείνει την ένταση της συστολής των μυϊκών ινών (Reid, 2001). Τέλος, συμμετέχουν και στην διαδικασία της αγγειογένεσης.

## 1.6.2 ΕΠΙΒΛΑΒΕΙΣ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου προσβάλλουν βιολογικά μακρομόρια (λιπίδια, πρωτεΐνες και νουκλεϊκά οξέα) προκαλώντας την καταστροφή ή αλλοίωσή τους. Μέσω αυτής της αρνητικής δράσης τους έχουν συνδεθεί με νευροεκφυλιστικές νόσους (Parkinson, Alzheimer), φλεγμονές, λοιμώδεις νόσους, νόσους των νεφρών, ηπατικές νόσους, πνευμονικές νόσους, με τη γήρανση καθώς και με διάφορους τύπους καρκίνου.

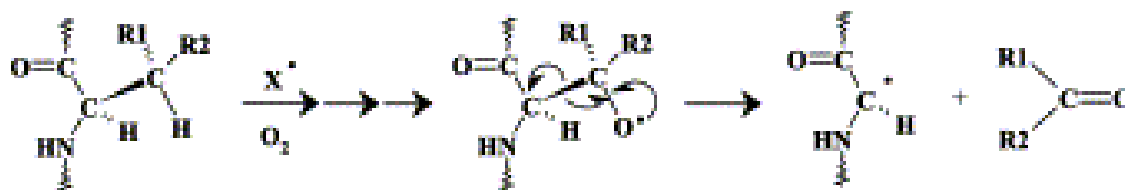
Λιπίδια → Οι κυτταρικές μεμβράνες είναι πλούσιες σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), τα οποία οξειδώνονται από τις ελεύθερες ρίζες οδηγώντας στις αλυσιδωτές αντιδράσεις της λιπιδικής υπεροξειδωσης (Alessio, 1993; Mylonas&Kouretas, 1999). Μία ελεύθερη ρίζα ( $R^\bullet$ ) δηλαδή, μπορεί να οδηγήσει σε υπεροξειδωση των λιπαρών οξέων των μεμβρανικών λιπιδίων (LH) και στον σχηματισμό νέων ελεύθερων ριζών. Οι αντιδράσεις οδηγούν στον σχηματισμό μιας ρίζας με κεντρικό μόριο τον άνθρακα ( $L^\bullet$  ή  $C^\bullet$ ) η οποία στην συνέχεια αντιδρά με ένα μόριο  $O_2$  οδηγώντας στον σχηματισμό μιας ρίζας περοξυλίου ( $LOO^\bullet$  ή γενικά  $ROO^\bullet$ ).

Οι αντιδράσεις της λιπιδικής υπεροξειδωσης φαίνονται παρακάτω:



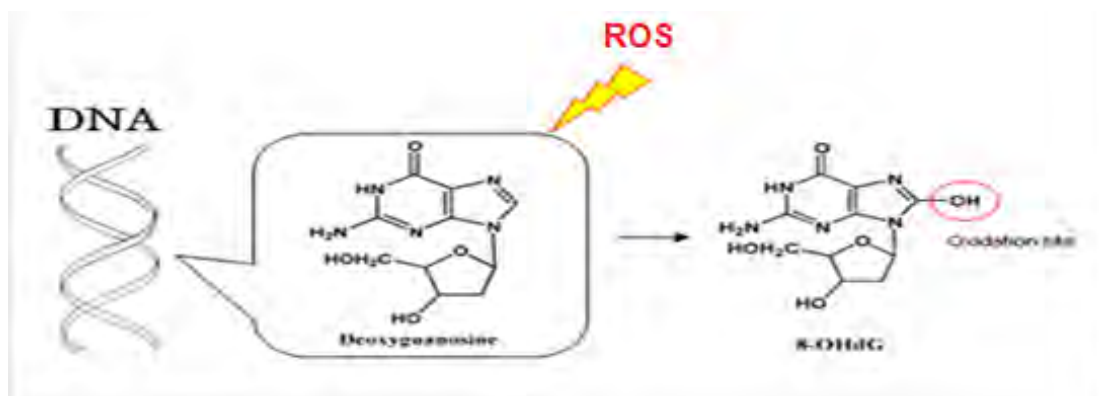
Πρωτεΐνες → Οι πρωτεΐνες είναι στόχος της δράσης των ελευθέρων ριζών όταν αυτές έχουν υψηλή συγκέντρωση. Ανάμεσα στις διάφορες ROS, το  $OH^\bullet$ , το  $RO^\bullet$  και οι ενεργές ρίζες αζώτου προκαλούν πρωτεϊνική καταστροφή. Οι πρωτεΐνες υποβάλλονται

σε άμεση και έμμεση καταστροφή μετά την αλληλεπίδραση με ROS όπως είναι οι αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, ο εκφυλισμός και ο θρυμματισμός τους. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής είναι απώλεια της ενζυμικής λειτουργίας, αλλαγμένες κυτταρικές λειτουργίες όπως παραγωγή ενέργειας και αλλαγές στον τύπο και στο επίπεδο των κυτταρικών πρωτεϊνών (Davies 1987; Grune et al. 1997; Levine & Stadtman 2001).



**Εικόνα 3: Αντίδραση πρωτεϊνικής οξείδωσης**

DNA→Αν και το DNA είναι ένα σταθερό και καλά προστατευμένο μόριο οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να προκαλέσουν καταστροφές όπως η τροποποίηση των βάσεων, θραύσεις του DNA, απώλεια πουρινών, ζημιά στο σάκχαρο δεοξυριβόζης και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Η ρίζα υδροξυλίου (OH•) επιτίθεται στην γουανίνη στην θέση C-8 και σχηματίζει ένα οξειδωτικό προϊόν την 8-υδροξυγουανίνη (8-OHdG). Οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν επίσης να επιτεθούν και σε άλλες βάσεις όπως η αδενίνη για να σχηματίσουν την 8-υδροξαδενίνη. Αλληλεπίδραση ανάμεσα στις πυριμιδίνες και στις ρίζες υδροξυλίου οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου της θυμίνης, 5-ουρακίλης, γλυκολών της θυμίνης και άλλων παρεμφερών προϊόντων (Dizdaroglu et al. 2002; Helbock et al. 1999; B. N. Ames 1986).



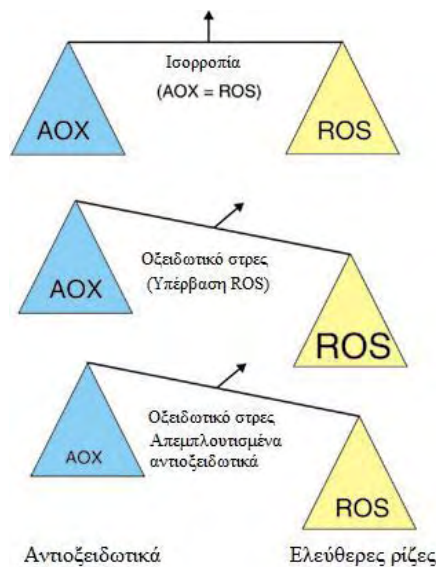
**Εικόνα 4:** Οξείδωση της βάσης γουανίνης του DNA από δραστικές μορφές οξυγόνου

### 1.7 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

Σε κάθε βιολογικό σύστημα πρέπει να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ του σχηματισμού και της εξουδετέρωσης ROS και RNS. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Σε περίπτωση, όμως, που προκύψει μια σοβαρή δυσαναλογία μεταξύ της ποσότητας ROS, RNS και της λειτουργίας του αντιοξειδωτικού μηχανισμού του οργανισμού σε βάρους του τελευταίου, τότε παρατηρείται το φαινόμενο του **οξειδωτικού στρες** (Pisoschi & Pop 2015). Το φαινόμενο αυτό, δημιουργεί μια άνιση σχέση προοξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ισορροπίας, η οποία καταλήγει σε μια σειρά δομικών και λειτουργικών κυτταρικών αλλαγών, που μπορούν να οδηγήσουν το κύτταρο σε απόπτωση ή νέκρωση.

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκληθεί είτε από:

1. Μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Αυτό μπορεί να συμβεί είτε εξαιτίας μεταλλάξεων ή τοξικών παραγόντων που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων είτε από τη μείωση των διατροφικών αντιοξειδωτικών ουσιών.
2. Αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS/RNS). Αυτό συμβαίνει είτε από έκθεση των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα ROS είτε σε παράγοντες που οδηγούν στην αυξημένη παραγωγή σε ROS.



**Εικόνα 3: Σχηματική απεικόνιση του οξειδωτικού στρες**

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει:

- ο Βλάβη στους ιστούς. Το οξειδωτικό στρες μπορεί να προκαλέσει βλάβες σε όλα τα μακρομόρια (DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια). Οι πρωτεΐνες μπορεί να υποστούν αλλαγές στην τριτοταγή τους δομή, εκφυλισμό και γενικότερα άμεση και έμμεση καταστροφή. Οι επιπτώσεις της πρωτεϊνικής καταστροφής σχετίζονται συνήθως με την απώλεια της φυσιολογικής λειτουργίας των πρωτεϊνών. Όσον αφορά το DNA, οι τροποποιήσεις των βάσεων, οι θραύσεις των αλυσίδων του, οι καταστροφές στο σάκχαρο της δεοξυριβόζης και οι βλάβες στο σύστημα επιδιόρθωσης του είναι μερικές επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες που μπορεί να οδηγήσουν στον εκφυλισμό του.

- ο Κυτταρικό θάνατο. Αυτό μπορεί να συμβεί με δύο μηχανισμούς, τη νέκρωση και την απόπτωση. Και οι δύο προκύπτουν από το οξειδωτικό στρες. Στο νεκρωτικό κυτταρικό θάνατο, το κύτταρο διογκώνεται και διαρρηγνύεται, απελευθερώνοντας το περιεχόμενό του στον περιβάλλοντα χώρο και επηρεάζοντας τα γειτονικά κύτταρα. Ακόμη και αν ένα κύτταρο οδηγείται σε θάνατο από μηχανισμούς άλλους εκτός του οξειδωτικού στρες, ο νεκρωτικός κυτταρικός θάνατος μπορεί να οδηγήσει σε οξειδωτικό στρες στον περιβάλλοντα χώρο. Στην απόπτωση, ο "μηχανισμός αυτοκτονίας" του κυττάρου ενεργοποιείται, τα αποπτωτικά κύτταρα δεν απελευθερώνουν το περιεχόμενό τους και έτσι η απόπτωση γενικά δεν προκαλεί βλάβη

στα περιβάλλοντα κύτταρα. Ο αποπτωτικός κυτταρικός θάνατος μπορεί να επιταχυνθεί σε ορισμένες ασθένειες, όπως κάποιες νευροεκφυλιστικές ασθένειες στις οποίες εμπλέκεται το οξειδωτικό στρες (Halliwell&Gutteridge, 1998; Halliwell, 2001).

## **1.8 ANTIOΞΕΙΔΩΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ**

Τα αντιοξειδωτικά είναι ενώσεις ικανές είτε να καθυστερήσουν ή να αναστείλουν τις διεργασίες οξείδωσης που συμβαίνουν υπό την επίδραση του ατμοσφαιρικού οξυγόνου ή των δραστικών ειδών οξυγόνου ή αζώτου. Η αντιοξειδωτική ουσία βρίσκεται σε μικρές συγκεντρώσεις σε σύγκριση με το υπόστρωμα που οξειδώνεται και καθυστερεί σημαντικά ή αποτρέπει την οξείδωση του υποστρώματος αυτού (Krinsky 2002).

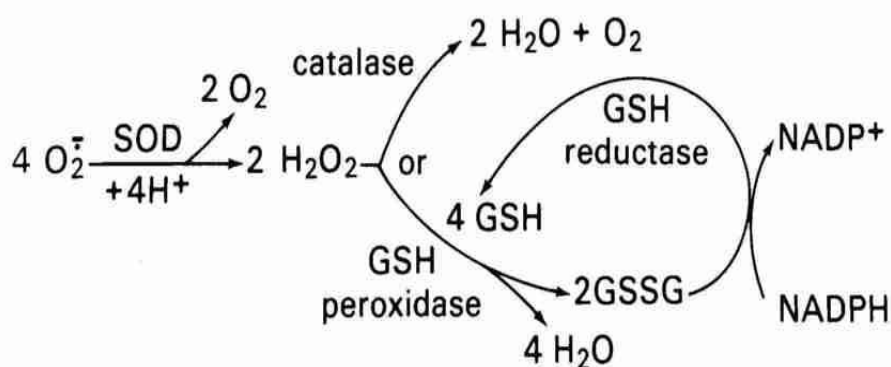
Τα αντιοξειδωτικά εμπλέκονται στο μηχανισμό άμυνας του οργανισμού έναντι των παθολογιών που συνδέονται με την επίθεση των ελευθέρων ριζών. Για να προστατεύσουν τα κύτταρα και τα οργανικά συστήματα του σώματος έναντι των ελευθέρων ριζών, ο οργανισμός έχει εξελίξει ένα πολύπλοκο σύστημα αντιοξειδωτικής προστασίας. Πρόκειται για μια ποικιλία συστατικών, τόσο ενδογενούς (από τον οργανισμό) όσο και εξωγενούς (κυρίως μέσω της διατροφής) προέλευσης, που λειτουργούν για να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες (Marketal., 1998). Το ενδογενές σύστημα περιλαμβάνει ενζυμικά αντιοξειδωτικά και αντιοξειδωτικούς μεταβολίτες, ενώ αυτά που λαμβάνονται με τη διατροφή είναι συνήθως μόρια μικρού μοριακού βάρους (Alessio&Hagerman, 2006; Halliwell & Gutteridge, 2007).

Υπάρχουν τόσο ενζυμικοί όσο και μη ενζυμικοί μηχανισμοί που εξουδετερώνουν ή ελέγχουν τη δράση των ελευθέρων ριζών. Αυτό επιτυγχάνεται με τρεις τρόπους.

- Εμποδίζουν το σχηματισμό ριζών
- Μετατρέπουν τις ελεύθερες ρίζες σε λιγότερο δραστικά μόρια
- Βοηθούν στην επιδιόρθωση των βλαβών που προκαλούνται από τις ελεύθερες ρίζες

### 1.8.1 ENZYMIKA ANTIOΞEΙΔΩΤΙΚΑ

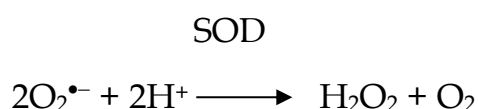
Ενζυμικές αντιοξειδωτικές ουσίες θεωρούνται η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης, η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Η υπεροξειδική δισμουτάση μετατρέπει το  $O_2^{\bullet-}$  σε  $H_2O_2$  και οξυγόνο. Η καταλάση με τη σειρά της μετατρέπει το  $H_2O_2$  σε νερό και οξυγόνο. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης μειώνει την λιπιδική υπεροξειδίωση και ανάγει το  $H_2O_2$  σε νερό. Η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης καταλύει την αναγωγή της γλουταθειόνης, δηλαδή μετατρέπει την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) στην ανηγμένη της μορφή της (GSH). Τέλος, η τρανσφεράση-S της γλουταθειόνης είναι ένα ένζυμο μεταβολισμού φάσης II, το οποίο καταλύει τη σύζευξη της GSH με κάποιο ξενοβιοτικό υπόστρωμα με σκοπό την αποτοξίνωσή του. Οι δράσεις τους φαίνονται συνοπτικά στο παρακάτω σχήμα (Valko *et al.* 2006).



Εικόνα 4: Δράση ενδογενών ενζυμικών αντιοξειδωτικών

#### 1.8.1.α ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΙΚΗ ΔΙΣΜΟΥΤΑΣΗ (SOD)

Το ένζυμο υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) υπάρχει σε όλους τους αερόβιους οργανισμούς. Καταλύει τη μετατροπή του  $O_2^{\bullet-}$  σε  $H_2O_2$ , σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση.



Υπάρχει σε τρεις μορφές, την κυτταροπλασματική που περιέχει Cu και Zn στο ενεργό της κέντρο (Cu/ZnSOD), τη μιτοχονδριακή με Mn στο ενεργό της κέντρο (MnSOD) και την εξωκυτταρική. Σε όλα τα κύτταρα κατά την ηρεμία το μεγαλύτερο

μέρος του παραγόμενου  $O_2^{\bullet-}$  από τα μιτοχόνδρια ανάγεται από τη μιτοχονδριακή SOD, ενώ το υπόλοιπο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα (Powers & Lennon, 2000). Στα μυϊκά κύτταρα το 65%-85% της δραστηριότητας της SOD εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα (Das et al., 1997).

Η κυτταροπλασματική μορφή της SOD (Cu/ZnSOD), είναι ένα ομοδιμερές 32 kD, και αποτελεί περίπου το 70% των μορφών της SOD. Είναι διάχυτη στο κυτταρόπλασμα και σε μικρότερο βαθμό στον πυρήνα, ενώ απουσιάζει από τα μιτοχόνδρια. Βρίσκεται στα περισσότερα όργανα, σε επιθήλια και σε όλους τους τύπους των φαγοκυττάρων (Crapo et al., 1992). Η μιτοχονδριακή Mn-SOD είναι ένα ένζυμο το οποίο αποτελείται από 4 όμοιες μεταξύ τους υπομονάδες 96 kD, που περιέχει ένα άτομο μαγγανίου ανά υπομονάδα (Whittaker, 2000). Η εξωκυττάρια-SOD (Cu/ZnSOD) είναι το μόνο ένζυμο που εξουδετερώνει τις ρίζες  $O_2^{\bullet-}$  στον εξωκυττάριο χώρο. Πρόκειται για μια τετραμερή γλυκοπρωτεΐνη, με μοριακό βάρος 135 kD, που περιέχει χαλκό και ψευδάργυρο και αποτελεί το 0,5-17% των μορφών της SOD. Ο ρόλος της συγκεκριμένης μορφής SOD είναι πολύ σημαντικός λόγω της εξωκυττάριας κατανομής της στους ιστούς (Oury et al., 1996).

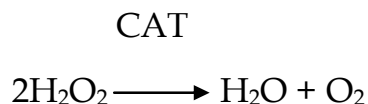
Η SOD θεωρείται ότι είναι από τα ένζυμα της πρώτης γραμμής άμυνας απέναντι σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες (Michiel et al., 1994).

#### **1.8.1.β. ΚΑΤΑΛΑΣΗ (CAT)**

Η καταλάση είναι το ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση του  $H_2O_2$  σε  $H_2O$  και  $O_2$ . Ένα μόριο CAT μπορεί να μετατρέψει 83.000 μόρια  $H_2O_2$  το δευτερόλεπτο σε νερό και οξυγόνο. Βρίσκεται κυρίως στα υπεροξειδωσώματα, τα οποία είναι κυτταρικές δομές που χρησιμοποιούν το οξυγόνο για την απομάκρυνση τοξικών ουσιών οδηγώντας στην παραγωγή  $H_2O_2$  (Antunes et al., 2002) αλλά και στα μιτοχόνδρια και το κυτταρόπλασμα. Το μεγαλύτερο ποσοστό του ενζύμου εντοπίζεται στα ερυθροκύτταρα, τους νεφρούς και το ήπαρ (Chance et al., 1986; Masters et al., 1986). Είναι ένα τετραμερές ένζυμο το οποίο αποτελείται από 4 πολυπεπτιδικές αλυσίδες μεγέθους τουλάχιστον 500 αμινοξέων. Στο τετραμερές αυτό υπάρχουν 4 πορφυρινικές ομάδες αίμης, οι οποίες επιτρέπουν στην καταλάση να αντιδρά με το  $H_2O_2$  (Halliwell & Gutteridge, 1998).

Η CAT καταλύει τη μετατροπή του  $H_2O_2$  σε  $H_2O$  και  $O_2$  σύμφωνα με την αντίδραση:





Το  $\text{H}_2\text{O}_2$  που παράγεται από τη δράση της SOD διασπάται από την CAT κι έτσι αναστέλλει τόσο τις βλαβερές επιδράσεις του ίδιου στα βιομόρια όσο και τις επιδράσεις του  $\text{OH}^\bullet$ , στο οποίο μπορεί να μετατραπεί.

## 1.8.2 ΜΗ ENZYΜΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

### 1.8.2.α. Βιταμίνη Ε (τοκοφερόλη)

Η βιταμίνη Ε είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη που αποτελείται από πολλές ισομορφές, γνωστές ως τοκοφερόλες. Η α-τοκοφερόλη είναι η πιο ενεργή και άφθονη μορφή (Fuchs et al., 2003). Η βιταμίνη Ε είναι γνωστή ως ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό λόγω της αφθονίας της στα κύτταρα και τις μιτοχονδριακές μεμβράνες και λόγω της ικανότητάς της να αντιδρά απευθείας με τις ROS (Evans, 2000). Αλληλεπιδρά με πολυάριθμα αντιοξειδωτικά όπως βιταμίνη C, GSH, β-καροτένιο ή λιποϊκό οξύ, τα οποία έχουν την ικανότητα να αναγεννούν τη βιταμίνη Ε από την οξειδωμένη της μορφή (Coombes et al., 2001). Διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις κυτταρικές μεμβράνες καθώς σταματάει τη λιπιδική υπεροξείδωση. Η μοριακή δομή της διευκολύνει την απενεργοποίηση των ROS σε ένα λιπιδικό περιβάλλον, ιδιαίτερα τις ρίζες υπεροξυλίου που προέρχονται από την οξείδωση της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) (Vasankari et al., 1999; Mastaloudis et al., 2001).

### 1.8.2.β. Βιταμίνη C

Η βιταμίνη C είναι μια υδατοδιαλυτή βιταμίνη και το πιο σημαντικό αντιοξειδωτικό στα εξωκυττάρια υγρά αλλά είναι αποτελεσματική και στο κυτταρόπλασμα (Bigard, 2001; Palmer et al., 2003). Η βιταμίνη C είναι πιο άφθονη σε ιστούς όπου η παραγωγή ROS είναι πιο σημαντική. Αυτό το φαινόμενο ορίζεται ως προσαρμογή απέναντι στο οξειδωτικό στρες. Στα εξωκυττάρια υγρά, η βιταμίνη C έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει ROS ( $\text{OH}^\bullet$ ,  $\text{O}_2^{\bullet-}$ ,  $\text{LOO}^\bullet$ ,  $\text{RO}^\bullet$ ) (Bigard, 2001). Η βιταμίνη C έχει επίσης την ικανότητα να παγιδεύει ιόντα χαλκού, τα οποία έχουν πολύ ισχυρή οξειδωτική δράση.

### 1.8.2.γ. Β-καροτένιο και βιταμίνη Α (ρετινόλη)

Η βιταμίνη Α είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη παρούσα σε πολλές λιπιδικές ουσίες. Το β-καροτένιο, παρόν σε κυτταρικές μεμβράνες, μετατρέπεται σε βιταμίνη Α όταν ο οργανισμός το χρειάζεται. Αν και ο μηχανισμός της *in vivo* δράσης δεν είναι ξεκάθαρος, το β-καροτένιο απενεργοποιεί τις ROS (ιδιαίτερα το  $^1\text{O}_2$  και λιπιδικές ρίζες) και μειώνει τη λιπιδική υπεροξείδωση (Powers & Lennon, 2000; Ozhogina & Kasaikina, 1995). Αν και λιγότερο σημαντική από τη βιταμίνη Ε, η βιταμίνη Α και το β-καροτένιο ενεργούν από κοινού με τη βιταμίνη C και τη βιταμίνη Ε με σκοπό να προστατεύσουν τα κύτταρα από τις ROS (Livrea et al., 1995).

#### 1.8.2.δ. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι φαινολικές ουσίες που σχηματίζονται στα φυτά από τα αμινοξέα φαινυλαλανίνη, τυροσίνη και μηλονικό (Willcox et al., 2002; Wedworth & Lynch, 1995). *In vitro* μελέτες έχουν τονίσει ότι η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών οφείλεται στην ικανότητα τους να αναστέλουν προ-οξειδωτικά ένζυμα ή να σχηματίζουν σύμπλοκα με προ-οξειδωτικά ιόντα όπως  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  ή  $\text{Cu}^{2+}$ . Τα φλαβονοειδή έχουν επίσης άμεση δράση παγίδευσης κάποιων ROS με άμεση δωρεά ατόμου υδρογόνου.

#### 1.8.2.ε. Γλουταθειόνη (GSH)

Είναι η πιο άφθονη μη πρωτεϊνική πηγή θειόλης στο κύτταρο και οι συγκεντρώσεις της στους περισσότερους ιστούς είναι στην κλίμακα των millimolar. Η GSH εξυπηρετεί πολλές λειτουργίες κατά την προστασία των ιστών από οξειδωτική βλάβη και τη διατήρηση του ενδοκυτταρικού περιβάλλοντος σε ανηγμένη κατάσταση (Meister & Anderson, 1983). Η GSH ανάγει το υδρογόνο και τα οργανικά υπεροξείδια μέσω μιας αντίδρασης που καταλύεται από την  $\text{GP}_x$ , εξουδετερώνει την  $\text{OH}^\cdot$  και το  $^1\text{O}_2$  και ανάγει τις ρίζες τοκοφερόλης εμποδίζοντας επομένως τη λιπιδική υπεροξείδωση (Niki et al., 1985).

Η GSH εκτός από αντιοξειδωτική δράση επιτελεί πολλαπλές λειτουργίες:

1. Η GSH συζεύγνυται με το NO για να σχηματίσει S-νιτροζογλουταθειόνη, το οποίο διασπάται από το σύστημα θειορεδοξίνης για να απελευθερώσει GSH και NO (Fang et al., 2002).
2. Χρησιμεύει ως υπόστρωμα για την αφυδρογονάση της φορμαλδεΰδης, η οποία μετατρέπει την φορμαλδεΰδη και την GSH σε S-φόρμυλο-γλουταθειόνη

(Townsend et al., 2003). Η απομάκρυνση της φορμαλδεΐδης (ένα καρκινογόνο) είναι φυσιολογικής σημασίας επειδή παράγεται από το μεταβολισμό της μεθειονίνης, της χολίνης, της μεθανόλης, της σαρκοσίνης και των ξενοβιοτικών ουσιών.

3. Η GSH είναι απαραίτητη για τη μετατροπή της προσταγλανδίνης  $H_2$  σε προσταγλανδίνες  $D_2$  και  $E_2$  από την ισομεράση του ενδοϋπεροξειδίου (Lu, 2000).
4. Η GSH συμμετέχει στο σύστημα της γλυοξυλάσης, η οποία μετατρέπει την μεθυλογλυοξυλάση σε D-γαλακτικό, ένα μονοπάτι δραστικό σε μικροοργανισμούς.

Επαρκείς συγκεντρώσεις GSH είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου των λεμφοκυττάρων και των εντερικών επιθηλιακών κυττάρων (Aw, 2003). Επιπλέον, η GSH είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων και των πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων καθώς και την παραγωγή κυτοκινών.

Η GSH μπορεί να συντεθεί τόσο από ενδογενή όσο και από αμινοξέα της διατροφής, αλλά μόνο το ήπαρ συμβάλει σε σημαντική *de novo* σύνθεση της.

#### **1.8.2.στ. Συνένζυμο $Q_{10}$**

Το συνένζυμο  $Q_{10}$  ( $CoQ_{10}$ ) είναι ένα ενδογενές μόριο το οποίο είναι απαραίτητο για τη σύνθεση ATP και είναι παρόν στη μιτοχονδριακή μεμβράνη (Linnane et al., 2002; Maulic et al., 2000). Το  $CoQ_{10}$  είναι γνωστό ότι ενεργεί ως αντιοξειδωτικό με άμεση δράση απέναντι στις ρίζες υπεροξυλίου ή με έμμεση δράση αναγεννώντας τις βιταμίνες C και E (Witt et al., 1992; Crane, 2001). Το  $CoQ_{10}$  έχει επίσης ωφέλιμες επιδράσεις, όπως η προστασία απέναντι σε καρδιαγγειακές ασθένειες, καρκίνο και κυτταρική γήρανση ή απόπτωση.

#### **1.8.2.ζ. Ουρικό οξύ**

Το ουρικό οξύ είναι το τελικό προϊόν μεταβολισμού των πουρινών στους ανθρώπους (Svensson et al., 2002; Grootveld & Halliwell, 1987; Hellsten et al., 1997). Η έντονη φυσική δραστηριότητα αυξάνει τις συγκεντρώσεις του ουρικού οξέος στο πλάσμα. Το ουρικό οξύ του πλάσματος διαχέεται στους μύες με σκοπό να τους προστατεύσει από οξείδωση προκαλούμενη από ελεύθερες ρίζες (Hellsten et al., 1998). Πράγματι, το ουρικό οξύ στο πλάσμα και τον μυ, είναι ένα από τα πιο σημαντικά

αντιοξειδωτικά με άμεσες επιδράσεις στο  $^1\text{O}_2$ , το HOCL, τις ρίζες υπεροξυλίου, το ONOO $^-$  ή το όζον ( $\text{O}_3$ ) (Ames et al., 1981; Wayner et al., 1987; Hooper et al., 1998,2000; Kean et al., 2000). Κάποιες μελέτες δείχνουν ότι το ουρικό οξύ αντιπροσωπεύει ένα σημαντικό κομμάτι (>50%) της αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος (Wayner et al., 1987). Έτσι, το ουρικό οξύ προστατεύει τα ερυθροκύτταρα, τις κυτταρικές μεμβράνες, το υαλουρονικό οξύ και το DNA από οξείδωση. Μια άλλη σημαντική αντιοξειδωτική ιδιότητα του ουρικού οξέος είναι η ικανότητά του να σχηματίζει σταθερά σύμπλοκα με ιόντα σιδήρου. Αυτή η διαδικασία εμποδίζει τον  $\text{Fe}^{3+}$  να δράσει προ-οξειδωτικά, την οξείδωση της βιταμίνης C και τη λιπιδική υπεροξείδωση (Davies et al., 1986; Sevanian et al., 1991).

### **1.8.2.η. Χολερυθρίνη**

Η χολερυθρίνη είναι το τελικό προϊόν καταβολισμού της πρωτεΐνης της αίμης. Η οξυγενάση της αίμης διασπά τον δακτύλιο της αίμης προς σχηματισμό χολοπρασίνης, η οποία στη συνέχεια ανάγεται από τη ρεδοκτάση της χολοπρασίνης σε χολερυθρίνη (Stocker, 2004). Αν και τόσο η χολερυθρίνη όσο και η χολοπρασίνη είναι αναγωγικά είδη, η χολερυθρίνη θεωρείται το καλύτερο φυσιολογικό αντιοξειδωτικό (Baranano et al., 2002). Πράγματι, η χολερυθρίνη κατέχει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση απέναντι στις ρίζες υπεροξυλίου και προστατεύει τα κύτταρα από τοξικά επίπεδα του  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Baranano et al., 2002; Stocker et al., 1987).

## **2. Επίδραση της διατροφής στην παραγωγή και εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών**

Η γνώση της βιολογίας των ελευθέρων ριζών θα μπορούσε να αποτελέσει αρχή για την εδραίωση μιας αποτελεσματικής διατροφικής υποστήριξης η οποία θα διασφάλιζε την προστασία των οργανισμών από την οξειδωτική καταπόνηση.

Διατροφική έλλειψη πρωτεϊνών επιδεινώνει τη σύνθεση αντιοξειδωτικών ενζύμων, μικρών πεπτιδίων (γλουταθειόνη) και αντιοξειδωτικών μεταβολιτών. Μελέτες σε ποντίκια έδειξαν πως ανεπαρκής πρόσληψη πρωτεΐνης οδηγεί σε έλλειψη ψευδαργύρου (Zn), συμπαράγοντα της Cu/Zn – SOD επηρεάζοντας έμμεσα την απομάκρυνση των σουπεροξειδικών ιόντων (Fang YZ, 2002).

Η μειωμένη πρωτεϊνοσύνθεση στο ήπαρ και σε εξωηπατικούς ιστούς μειώνει τη συγκέντρωση του πλάσματος σε αλβουμίνη (μεταφορέα ψευδαργύρου στην κυκλοφορία) και ενδοκυτταρικής μεταλλοθειονίνης (κύριου μεταφορέα ψευδαργύρου) (Dempster WS et al, 1995). Η αυξημένη συγκέντρωση ελεύθερου σιδήρου εξαιτίας της έλλειψης πρωτεϊνών προκύπτει ως αποτέλεσμα των χαμηλών συγκεντρώσεων τρανσφερίνης, λακτοφερίνης και φερριτίνης οι οποίες προσδένονται στον σίδηρο. (Brooks SE et al, 1995 ; Yun-Zhong Fang et al, 2002)

Έλλειψη της βιταμίνης E στη διατροφή μειώνει τη δραστηριότητα της ηπατικής καταλάσης, των υπεροξειδασών της GSH και της αναγωγάσης της γλουταθειόνης επάγοντας την υπεροξειδωση των ηπατικών λιπιδίων με αποτέλεσμα τις καρδιολογικές και καρδιαγγειακές διαταραχές (Carr AC *et al*, 2000). Οι Yokota T. et al., 2001 υπέδειξαν αυξήσεις στην υπεροξειδωση των λιπιδίων του εγκεφάλου και νευροεκφυλιστικές διαταραχές σε ποντίκια με έλλειψη της πρωτεΐνης μεταφοράς της α-τοκοφερόλης.

Τα αντιοξειδωτικά του γάλακτος, τόσο τα λιπόφιλα (όπως το συζευγμένο λινολεϊκό οξύ, οι βιταμίνες A και D<sub>3</sub>, τα φωσφολιπίδια) όσο και τα υδρόφιλα (πρωτεΐνες, πεπτίδια, βιταμίνες, μέταλλα και ιχνοστοιχεία) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της προοξειδωτικής και αντιοξειδωτικής ομοιόστασης του ανθρώπινου σώματος. Τα λιπόφιλα και τα υδρόφιλα αντιοξειδωτικά αλληλεπιδρούν απενεργοποιώντας τις ενεργές μορφές οξυγόνου και τα τελικά προϊόντα της λιπιδικής υπεροξειδωσης.

## 2.1 Πρόβειο γάλα

Η ιστορία του γάλακτος ξεκινά στη Νεολιθική περίοδο κατά τη μετάβαση από το Νομαδικό τρόπο ζωής στις οργανωμένες κοινωνίες και την εξημέρωση παραγωγικών ζώων. Αρχικά, στη Μέση Ανατολή εξημερώθηκαν αίγες και πρόβατα εξαιτίας του μεγέθους, της προσαρμοστικότητάς τους, της συμπεριφοράς και της κοινωνικής τους φύσης αποτελώντας για μακρά περίοδο πηγή τροφής (γάλακτος και κρέατος). Διαμέσου των αιώνων τα γάλα αποτέλεσε πολύτιμη πηγή θρεπτικών στοιχείων οδηγώντας στην εξελικτική επιλογή παραγωγικών φυλών (Yildiz 2010; Barlowska et al., 2011). Η παγκόσμια παραγωγή πρόβειου γάλακτος αποτελεί το 1.4 % (FAO 2015) ενώ οι γαλακτοπαραγωγικές φάρμες εκπροσωπούν σημαντικό τμήμα

των αγροτικών οικονομιών σε πολλές χώρες της Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής με την Ελλάδα να έρχεται δεύτερη με ποσοστό 8.7%, μετά την Κίνα με ποσοστό 12.2% (Barlowska et al., 2011). Η παραγωγή γάλακτος από μικρά μηρυκαστικά γνωρίζει άνθηση τα τελευταία χρόνια αναζητώντας νέες αγορές κατανάλωσης (Selvaggi et al., 2014). Στην Ευρώπη η παραγωγή πρόβειου γάλακτος ανερχόταν στους 9.1 εκατομμύρια τόνους το 2009 με την κατανάλωσή του σε υγρή μορφή να είναι σπάνια (Tamine et al., 2011) ενώ σε πολλές χώρες συμπεριλαμβανομένων των Ηνωμένων Πολιτειών διαμορφώνεται η τάση της κατανάλωσής του *in natura*. Ωστόσο τα πρόβεια γαλακτοκομικά προϊόντα κερδίζουν έδαφος λόγω της ποιότητας και της θρεπτικής τους αξίας εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε πρωτεΐνες, λιπαρά, βιταμίνες και μέταλλα (Park et al., 2007; Milani & Wendorff 2011).

Το πρόβειο γάλα χρησιμοποιείται κυρίως για την παραγωγή εκλεκτών ποικιλιών τυριών, γιαουρτιού και τυριών τυρογάλακτος (Haenlein and Wendorff 2006).

Ενώ η παραγωγή πρόβειου γάλακτος χάρη στις υψηλά γαλακτοπαραγωγικές φυλές είναι υψηλή, υπάρχει περιορισμός στην απόδοση σε σχέση με το αγελαδινό εξαιτίας της εποχικότητας (Albenzio and others 2016). Έτσι οι μικρές φάρμες καταψύχουν το νωπό προϊόν έως την συγκέντρωση αρκετής ποσότητας που θα προωθηθεί στην τυροκόμηση. Για την διατήρηση της υψηλής ποιότητας του πρόβειου γάλακτος απαιτείται η άμεση ψύξη σε χαμηλές θερμοκρασίες ( - 20°C) (Wendorff, 2011 ) όπου διατηρείται η σταθερότητα των πρωτεϊνών για διάστημα μεγαλύτερο των δώδεκα (12) μηνών.

### **2.1.1 Χαρακτηριστικά πρόβειου γάλακτος και φυσικοχημικές ιδιότητες**

Το γάλα αποτελεί έκκριση των αδένων των θηλαστικών, η σύσταση και τα φυσικά χαρακτηριστικά του οποίου ποικίλουν μεταξύ των ειδών, με το πρόβειο γάλα να κατέχει υψηλότερη θρεπτική αξία συγκριτικά με το αίγαιο και το αγελαδινό προσδίδοντας θερμιδική αξία της τάξης των 5932kJ/kg (Haenlein 2001; Kaminarides et al., 2007; Park et al., 2007; Barlowska et al., 2011). Χαρακτηρίζεται ως σύνθετο γαλάκτωμα ελαίου- ύδατος το οποίο περιέχει αδιάλυτες πρωτεΐνες, καζεΐνες, και διαλυτές πρωτεΐνες ορού. Στις καζεΐνες ανήκουν οι αs1, αs2, β, κ- καζεΐνη ενώ οι τις πρωτεΐνες του ορού αποτελούν οι α-λακταλβουμίνη και η β-λακτοσφαιρίνη. Συναντώνται λιπαρά οξέα, σάκχαρα όπως λακτόζη, μέταλλα, ένζυμα, ορμόνες,

ανοσοσφαιρίνες και βιταμίνες. Τέλος, σημαντικές μικρές πρωτεΐνες όπως η αλβουμίνη του ορού, οι ανοσοσφαιρίνες, η λακτοφερρίνη, η τρανσφερρίνη, η πρωτεΐνη που συνδέεται με ασβέστιο (Ca) ή με φολικό, η προλακτίνη. Η χημική σύσταση του φρέσκου πρόβειου γάλακτος ποικίλλει μεταξύ των διαφορετικών φυλών και μεταβάλλεται με την υγεία του ζώου, την ηλικία του, το στάδιο της γαλακτοφορίας, την παραγόμενη ποσότητα γάλακτος, την εποχή, τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος και τη θρέψη (Tamine et al., 2011; Clayes et al., 2014). Οι εποχιακές μεταβολές επηρεάζουν τη σύνθεση των λιπαρών οξέων εξαιτίας των μεταβολών στη σύνθεση της νομής των βοσκόντων ζώων (Zlatanov et al., 2002; Revilla et al., 2017), επηρεάζοντας άμεσα τη φυσιολογία του ζώου και τελικά την ποιότητα του παραγόμενου γάλακτος.

Η μέση πρωτεϊνική σύσταση του πρόβειου γάλακτος ανέρχεται στο 5.8% w/w σε σχέση με του αγελαδινού (3.3% w/w) με περιεκτικότητα σε άζωτο (N) στο 0.4-0.8% το οποίο διαμερίζεται σε κλάσματα και προσδίδει τη χαρακτηριστική δομή και υφή στο τελικό προϊόν της τυροκόμησης. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος απαντώνται σε δύο διακριτές φάσεις, την ασταθή μικυλλιακή που αποτελείται από καζεΐνες διαμέτρου 190nm σε ποσοστό 76-83% και τη διαλυτή φάση που αποτελείται από τις πρωτεΐνες τυρογάλακτος σε ποσοστό 17-22% κυρίως β-λακτοσφαιρίνη (β-Lg) και α-λακταλβουμίνη (α-La)

Διαθέτει υψηλή συγκέντρωση σφαιριδίων λίπους διαμέτρου 3.6 μm, μικρότερης των σφαιριδίων του αγελαδινού γάλακτος 4.0 μm (Gantner et al., 2015; Baltazar et al., 2017) χαρακτηριστικό το οποίο του προσδίδει συνεκτικότητα ευνοώντας το μη διαχωρισμό φάσεων κατά την κατάψυξη. Η απουσία συγκολλητίνης το καθιστά περισσότερο εύπεπτο (Clayes et al., 2014) σε σχέση με το αγελαδινό γάλα. Το ποσοστό της λακτόζης στα ολικά στερεά είναι 22% με 27% σε σχέση με το 33% και 40% στο αγελαδινό γάλα (Ramos & Juarez 2003). Η υψηλή θρεπτική αξία του πρόβειου γάλακτος συσχετίζεται με την περιεκτικότητα σε προλίνη η οποία επηρεάζει την παραγωγή της αιμοσφαιρίνης (Molik et al., 2012).

Περιέχει μεγαλύτερο ποσοστό των μεταβολικά δραστικών κορεσμένων λιπαρών οξέων όπως το καπροϊκό (C 6:0), καπρυλικό (C 8:0) και καπρικό (C 10:0) (Alonso et al., 1999; Goudjil et al., 2004) τα οποία του προσδίδουν τη χαρακτηριστική οσμή και γεύση.

Η περιεκτικότητά του σε μεταλλικά στοιχεία είναι υψηλότερη από εκείνη του μητρικού γάλακτος με το ασβέστιο (Ca), ενδεικτικά, να απαντάται σε συγκεντρώσεις των 193mg/100g, τη συγκέντρωση του φωσφόρου (P) στα 158 mg/100g. Όπως και το

μαγνήσιο, ο ψευδάργυρος, ο σίδηρος και ο χαλκός είναι σε υψηλότερα επίπεδα από το αγελαδινό γάλα. Η μεταβλητότητα της περιεκτικότητας διαμορφώνεται από τη φυλή, την εκτροφή, την υγεία και το στάδιο γαλακτοφορίας του παραγωγικού ζώου (Park & Chukwu, 1988). Τέλος, οι βιταμίνες B12 (0.712 μg/100g) και βιταμίνη C (4.16 mg/100g) βρίσκονται σε υψηλότερα επίπεδα από εκείνα του αγελαδινού και του αίγιου.

### 2.1.2 Αντιοξειδωτικά και βιοενεργά μόρια πρόβειου γάλακτος

Τα κύρια αντιοξειδωτικά του γάλακτος είναι το συζευγμένο λινολεϊκό οξύ CLA, οι βιταμίνες A και E, τα φωσφολιπίδια, το συνένζυμο Q<sub>10</sub> καθώς και υδρόφιλα πεπτίδια, μέταλλα, ιχνοστοιχεία και πρωτεΐνες. Παρά τον εντοπισμό τους σε διαφορετικές φάσεις (υδρόφιλη και υδρόφοβη) και του επιπέδου βιολογικής ενεργότητάς τους, αλληλεπιδρούν αποτελεσματικά συνθέτοντας ένα αντιοξειδωτικό δίκτυο, με τις πρωτεΐνες να επιδεικνύουν το υψηλότερο αντιοξειδωτικό δυναμικό (Zulueta et al., 2009; Mann et al., 2015).

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν την αφθονότερη πηγή σε CLA (Huth, 2007) με το πρόβειο γάλα να περιέχει CLA σε ποσότητα διπλάσια σε σχέση με το αγελαδινό. Το CLA αποτελεί το πιο ενεργό αντιοξειδωτικό στο λίπος του γάλακτος των μηρυκαστικών με αντιοξειδωτική ικανότητα 100 φορές υψηλότερη της α-τοκοφερόλης (Badr El-Din & Omaye, 2007) που διαθέτει συζευγμένους διπλούς δεσμούς και συναντάται με τη μορφή των *cis* και *trans* ισομερών. Φυσικά *trans* ισομερή λιπαρών οξέων όπως το βακενικό οξύ, πρόδρομο μόριο των *cis*-9 και *trans*-11 CLA ισομερών, αποτελούν το 4-6% των ολικών λιπαρών οξέων. Ενώ τα *cis* λιπαρά οξέα μετατρέπονται σε βιοδιαθέσιμες μορφές όταν οι λιπάσες των βακτηρίων του προστομάχου *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium lochheadi* και *Celobioarum* υδρολύουν τα τριγλυκερίδια της διατροφής του ζώου. Το βακενικό οξύ αποτελεί επίσης συστατικό των φωσφολιπιδίων και γλυκολιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών, υπεύθυνο για την ακεραιότητα και τη λειτουργία ιστών και οργάνων, επιδεικνύοντας ταυτόχρονα αντιαθηρωματική και αντικαρκινική δράση (Jakobsen et al., 2006).

*In vitro* καθώς και *in vivo* μελέτες απέδειξαν την ικανότητα των *cis*-9 και *trans*-11 CLA να αναστείλουν ογκοκύτταρα, να παρατείνουν το χρόνο έναρξης αθηρωματικών βλαβών και διαβήτη τύπου A, να μειώνουν την εναπόθεση υποδόριου



λίπους και να δρουν ανοσοδιεγερτικά και βακτηριοστατικά (Parodi, 2003). Με τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες, το προσλαμβανόμενο με τη διατροφή CLA προστατεύει τα δομικά λιπίδια από τις ελεύθερες ρίζες και τις ενεργές μορφές οξυγόνου (Palacios et al., 2003; Kim et al., 2005), συνδεόμενο μαζί τους (Ali et al., 2012). Πρόσληψη συμπληρώματος 0.5% CLA στη διατροφή ποντικών μείωσε τις συγκεντρώσεις τριγλυκεριδίων και χοληστερόλης (Kim et al., 2005) ενώ μελέτες σε ζώα ενδεικνύουν ως συνιστώμενη για την πρόληψη της καρκινογένεσης την ημερήσια πρόσληψη 3.5 g γραμμαρίων CLA (Varga-Visi and Csapo 2003). Τυχαιοποιημένες μελέτες σε υγιείς εθελοντές επιβεβαίωσαν την ανοσοδιεγερτική του δράση με το διατροφικό συμπλήρωμα μίγματος των δύο ισομερών (cis- 9 , trans-11 και trans-10, cis -12 σε αναλογία 1:1) σε ημερήσια δόση των 3 g για 12 εβδομάδες να αυξάνει τα επίπεδα των αντισωμάτων IgA και IgM μειώνοντας εκείνα των IgE (Corino et al., 2009; Menon et al., 2010).

Η βιταμίνη Ε ως ενεργό λιπόφιλο αντιοξειδωτικό δρα προστατευτικά της αυτοοξειδωσης του λίπους του γάλακτος (Lindmark-Mansson and Akesson 2000; Sumaric et al. 2012) απαντώμενη με τη μορφή της ισχυρότερης αντιοξειδωτικά α-τοκοφερόλης (Akoh and Min 2008; Kalac 2012). Ενισχύει την δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων που εξαρτώνται από την γλουταθειόνη (GSH), υπεροξειδάση, τρανσφεράση και αναγωγή της γλουταθειόνης δημιουργώντας σταθερές ρίζες τοκοφερόλης (TOC -O<sup>-</sup>) οι οποίες αντιδρούν με τις υπεροξειδικές ρίζες τερματίζοντας τις αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών (Della-Penna and Pogson 2006). Ενώ δρα συνεργιστικά με το σελήνιο (Se) για την προστασία των κυτταρικών μεμβρανών από τη λιπιδική υπεροξειδωση Τα επίπεδα της περιεκτικότητας του σιτηρεσίου ή της νομής σε τοκοφερόλες διαμορφώνουν την περιεκτικότητα του γάλακτος σε βιταμίνη Ε.

Το πρόβειο γάλα αποτελεί, επίσης, πλούσια πηγή βιοδιαθέσιμης βιταμίνης Α (146 IU/100g) τα επίπεδα της οποίας καθορίζονται από τη σύσταση του σιτηρεσίου σε καροτενοειδή (πρόδρομα μόρια). Το χαμηλού μοριακού βάρους αντιοξειδωτικό, λόγω της παρουσίας συζευγμένων διπλών δεσμών που απορροφούν το μονήρες οξυγόνο, προλαμβάνει την οξείδωση του κλάσματος της LDL, ορισμένους τύπους καρκίνου του δέρματος που επάγονται από την υπεριώδη ακτινοβολία (Palozza et al. 2002; Sharoni et al. 2012).

Η βιταμίνη D3 αναστέλλει τη λιπιδική υπεροξειδωση (Mutlu et al.2013) ενώ ημερήσια πρόσληψη υψηλότερη των 400IU ημερησίως μειώνει σημαντικά τις αυτοάνοσες διαταραχές (Merlino et al.2004;Munger et al 2004).

Στο λίπος του γάλακτος περιέχεται σε μικρά ποσοστά το συνένζυμο Q10 ,ένα υψηλά δραστικό αντιοξειδωτικό του οποίου η ανηγμένη μορφή (ουβικινόλη) ,προστατεύει τις κυτταρικές μεμβράνες και την LDL από την υπεροξειδωση και συμμετέχει στην αναγέννηση της ανηγμένης μορφής της βιταμίνης E.(Modi et al.2006;Littarru and Tiano 2007).

Αντιοξειδωτικές ιδιότητες διαθέτουν επίσης οι πρωτεΐνες, καζεΐνες και πρωτεΐνες ορού καθώς και τα πεπτίδια τα οποία απελευθερώνονται από τα πρωτεολυτικά ένζυμα. Με την υδρόλυση των καζεϊνών προκύπτουν τα αμινοξέα ιστιδίνη, λυσίνη, προλίνη και τυροσίνη τα οποία εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες (Power et al.2013).Αλληλουχίες καζεϊνών μοριακού βάρους 3 kDa απενεργοποιούν τη ρίζα DPPH αναλογικά με το επίπεδο συγκέντρωσής τους στο περιβάλλον αντίδρασης (Sakanaka et al.2005).

Οι πρωτεΐνες του ορού λακτοφερρίνη και β-λακτοσφαιρίνη επηρεάζουν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες του γάλακτος επιδεικνύοντας **ανοσοδιεγερτικές** και αντικαρκινικές ιδιότητες in vitro. Ως πηγή κυστεΐνης αποτελούν υπόστρωμα της σύνθεσης του συστημικού αντιοξειδωτικού γλουταθειόνης ενώ η περιεκτικότητά τους σε ιστιδίνη και άλλα υδρόφοβα αμινοξέα τους προσδίδουν αντιοξειδωτική δράση(Jimenez et al.2012;Power et al.2013;O’Keeffe and FitzGerald 2014).

Η λακτοφερρίνη προσδένεται με τον σίδηρο αυξάνοντας τη βιοδιαθεσιμότητά του και μπλοκάρωντας την προοξειδωτική του δράση.Προλαμβάνει την αποίκηση παθογόνων στη γαστροοισοφαγική οδό ,προάγει την ανάπτυξη των ευεργετικών βακτηριακών ειδών ενώ αναστέλλει την απελευθέρωση οξυγόνου από τα λευκοκύτταρα στα σημεία της φλεγμονής (Steijns and van Hooijdonk 2000;Wakabayashi et al.2006).

Ενώ η β λακτοσφαιρίνη προσδένεται με τις βιταμίνες προστατεύοντάς τες από την οξειδωση κατά τη μεταφορά τους από τον στόμαχο στο λεπτό έντερο (Liang et al.2011b) .

Τέλος τα ένζυμα ουδετεροποιούν τις ελεύθερες ρίζες και τις ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) επαυξάνοντας την αντιοξειδωτική ικανότητα του γάλακτος (Fang et al.2002).Η

υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) μετατρέπει τη ρίζα σουπεροξειδικού ανιόντος σε υπεροξειδίο του υδρογόνου που διαθέτει αντιμικροβιακές ιδιότητες (Filipovic et al. 2003; Miller 2004). Η καταλάση (CAT) ,εντοπίζεται κυρίως προσδεδεμένη στις μεμβράνες των σφαιριδίων λίπους (Fox and Kelly 2006) και καταλύει τη μετατροπή του  $H_2O_2$  σε οξυγόνο και νερό. Ομοίως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSHPx) η οποία εντοπίζεται σε μικρές ποσότητες και αποτελεί μεταφορέα του 30% του σεληνίου (Se). Ενώ η λακτοπεροξειδάση (LPx) ,ειδικό γαλακτικό ένζυμο, καταλύει αντιδράσεις οξείδωσης στις οποίες το  $H_2O_2$  είναι ο δέκτης υδρογόνου και διαθέτει βακτηριοστατικές και βακτηριοκτόνες ιδιότητες.

### 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

#### 3.1 Υλικά

##### Αντιδραστήρια

Το χημικό αντιδραστήριο 1,1-διφαινυλ-2-πικρυδραζύλιο (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) αποκτήθηκε από την εταιρία Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

##### Δείγματα

Χρησιμοποιήθηκαν 150 δείγματα πρόβειου γάλακτος από 5 μικρές φάρμες (30 δείγματα / φάρμα) της περιοχής των Τρικάλων. Σε κάθε φάρμα έγινε συλλογή γάλακτος σε καθημερινή βάση για ένα διάστημα 30 ημερών.

Φάρμα 1	Παλαιόπυργος Τρικάλων
Φάρμα 2	Κρηνίτσα Τρικάλων
Φάρμα 3	Πρίνος Τρικάλων
Φάρμα 4	Αγ. Βησσαρίωνας Τρικάλων
Φάρμα 5	Λογγάκι Τρικάλων

##### Διατροφή ζώων

Στα ζώα της **φάρμας 1** (Παλαιόπυργος Τρικάλων) εφαρμόζεται ημιεντατικό σύστημα εκτροφής, ποιμνιακό στατικό. Χρησιμοποιούνται φυσικές, πεδινές (κάτω των 600 m), βοσκήσιμες εκτάσεις, οι οποίες καλύπτονται από μικτή ποώδη και ξυλώδη βλάστηση. Η διατροφή συμπληρώνεται κατά τον ενσταβλισμό με χορήγηση ζωοτροφών, όπως ενσιρωμάτων αραβοσίτου και αχύρων σίτου, δημητριακών καρπών και συμπυκνωμένων ζωοτροφών που προκύπτουν ως υποπροϊόντα βιομηχανιών που χρησιμοποιούν δημητριακούς καρπούς όπως πίτυρα και υποπροϊόντα βιομηχανιών σπορελαιουργίας όπως ηλιάλευρο.

Στα ζώα της **φάρμας 2** (Κρηνίτσα Τρικάλων) εφαρμόζεται ημιεντατικό σύστημα εκτροφής, ποιμνιακό, στατικό με περιορισμό στον χώρο βόσκησης οπότε προκύπτει σταδιακά υπερβόσκηση των ευγευστότερων φυτικών ειδών και προοδευτική υποβάθμιση της ευρωστίας των άριστων νομευτικών ειδών και μείωση της αφθονίας

τους. Το κύριο σιτηρέσιο κάλυψης των διατροφικών αναγκών διαμορφώνεται με χορήγηση ζωοτροφών αχύρων σίτου, χλόης μηδικής καθώς και συμπυκνωμένων ζωοτροφών δημητριακών καρπών αραβοσίτου, κριθής και σπερμάτων βαμβακιού και πίτυρων σίτου.

Στα ζώα της **φάρμας 3** (Πρίνος Τρικάλων) εφαρμόζεται ημιεντατικό σύστημα εκτροφής, ποιμνιακό, μετακινούμενο με δυνατότητα ευρύτερης βόσκησης σε βοσκή χαμηλής ζώνης έως 600 m με συνθήκες ευνοϊκές για την ανάπτυξη χλόης. Στον διαθέσιμο βοσκότοπο παρατηρείται διακύμανση της βλάστησης κατά τη μετάβαση από το βλαστικό στάδιο στο στάδιο της ανθοφορίας των φυτικών ειδών με το μέγιστο της διακύμανσης στην αρχή της Άνοιξης, οφειλόμενο στις βροχοπτώσεις και τη θερμοκρασία που επικράτησαν από 01/03 έως 31/03 (περίοδος δειγματοληψίας). Η κάλυψη των βασικών διατροφικών αναγκών καλύπτεται με χορήγηση αχύρων σίτου και κριθής, σανών βρώμης και μηδικής, δημητριακών καρπών αραβοσίτου, κριθής και χαρουπιών καθώς και πίτυρων σίτου και ηλιόλευρων.

Στα ζώα της **φάρμας 4** (Άγιος Βησσαρίωνας Πύλης –διαχείμαση / Διάσελο Στουρναρέϊκων Πύλης) εφαρμόζεται εκτατικό σύστημα όπου χρησιμοποιούνται μεγάλες βοσκήσιμες εκτάσεις μεσαίας ζώνης (600 m – 800 m) από τον Οκτώβρη έως και το τρίτο δεκαήμερο του Απριλίου κάθε έτους οπότε μετακινούνται σε βοσκές υψηλής ζώνης αλπικών περιοχών (> των 1700 m). Η χλωριδική σύνθεση των βοσκοτόπων είναι νανοφυούς, πυκνοφυούς ανάπτυξης και δεν έχει υποστεί υποβάθμιση εφόσον δεν υφίσταται υπερβόσκηση. Οι ζωοτροφές κάλυψης βασικών αναγκών αποτελούνται από άχυρα σίτου και κριθής καθώς και από χλόη λειμώνων και μηδικής. Προστίθενται δημητριακοί καρποί αραβοσίτου και πίτυρα σίτου. Ενώ ο απογαλακτισμός κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας είναι σε εξέλιξη αλλά δεν έχει εγκαθιδρυθεί.

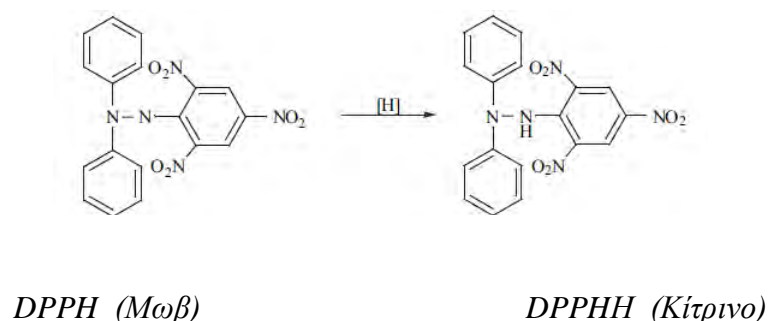
Στα ζώα της **φάρμας 5** εφαρμόζεται ποιμνιακό, στατικό, εντατικό σύστημα εκτροφής με ελάχιστη παραμονή σε φυσική βοσκήσιμη περιοχή και έμφαση στην διαμόρφωση σιτηρεσίου γαλακτοπαραγωγής με ενσιρώματα χλόης αραβοσίτου, μηδικής και λειμώνων, με δημητριακούς καρπούς αραβοσίτου, κριθής, σίκαλης και σίτου καθώς και σπέρματα σόγιας και πίτυρα σίτου αλλά και ηλιόλευρο και σογιάλευρο.

Στο σύνολο των εκτροφών χορηγούνται πλάκες ιχνοστοιχείων και μετάλλων, ισορροπιστών της εκάστοτε σύνθεσης του σιτηρεσίου.

### 3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

#### ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΔΕΣΜΕΥΣΗΣ ΤΗΣ ΣΤΑΘΕΡΗΣ ΡΙΖΑΣ DPPH•

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH• πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Brand-Williams et al. (Brand-Williams et al., 1995). Η μέθοδος που εφαρμόστηκε αποτελεί μια παραλλαγή της αρχικής μεθόδου και είναι μια από τις πιο χαρακτηριστικές και απλές μεθόδους για την αρχική εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ισχύος αντιοξειδωτικών μορίων ή εκχυλισμάτων πλούσιων σε ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασίζεται στην αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων μορίων με την σταθερή ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•). Η ρίζα DPPH• μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου είτε ενός ατόμου υδρογόνου (Prior et al., 2005). Είναι μια σταθερή οργανική ρίζα αζώτου η οποία έχει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517 nm. Όταν στο διάλυμα της ρίζας προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε το 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•) ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H) η οποία έχει κίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση να ελαττώνεται.



**Εικόνα 5:** Χημική δομή της ένωσης 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH•) καθώς και της ανηγμένης της μορφής 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H).

Πιο αναλυτικά, η αντίδραση με τη ρίζα πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 mL, στο οποίο περιέχονται μεθανόλη (διαλύτης), 100  $\mu\text{M}$  ρίζας DPPH• και το δείγμα σε διαφορετικές αυξανόμενες ποσότητες. Μετά την προσθήκη των συστατικών της αντίδρασης τα δείγματα ανακινούνται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 20 min. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 517 nm. Σε κάθε πείραμα η ρίζα DPPH• (100  $\mu\text{M}$ ) μαζί με την μεθανόλη αποτελούσε το μάρτυρα. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης. Επίσης, ελέγχθηκε αν το κρασί απορροφούσε στις εξεταζόμενες ποσότητες στα 517 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

Η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_o - A_d) / A_o \times 100$$

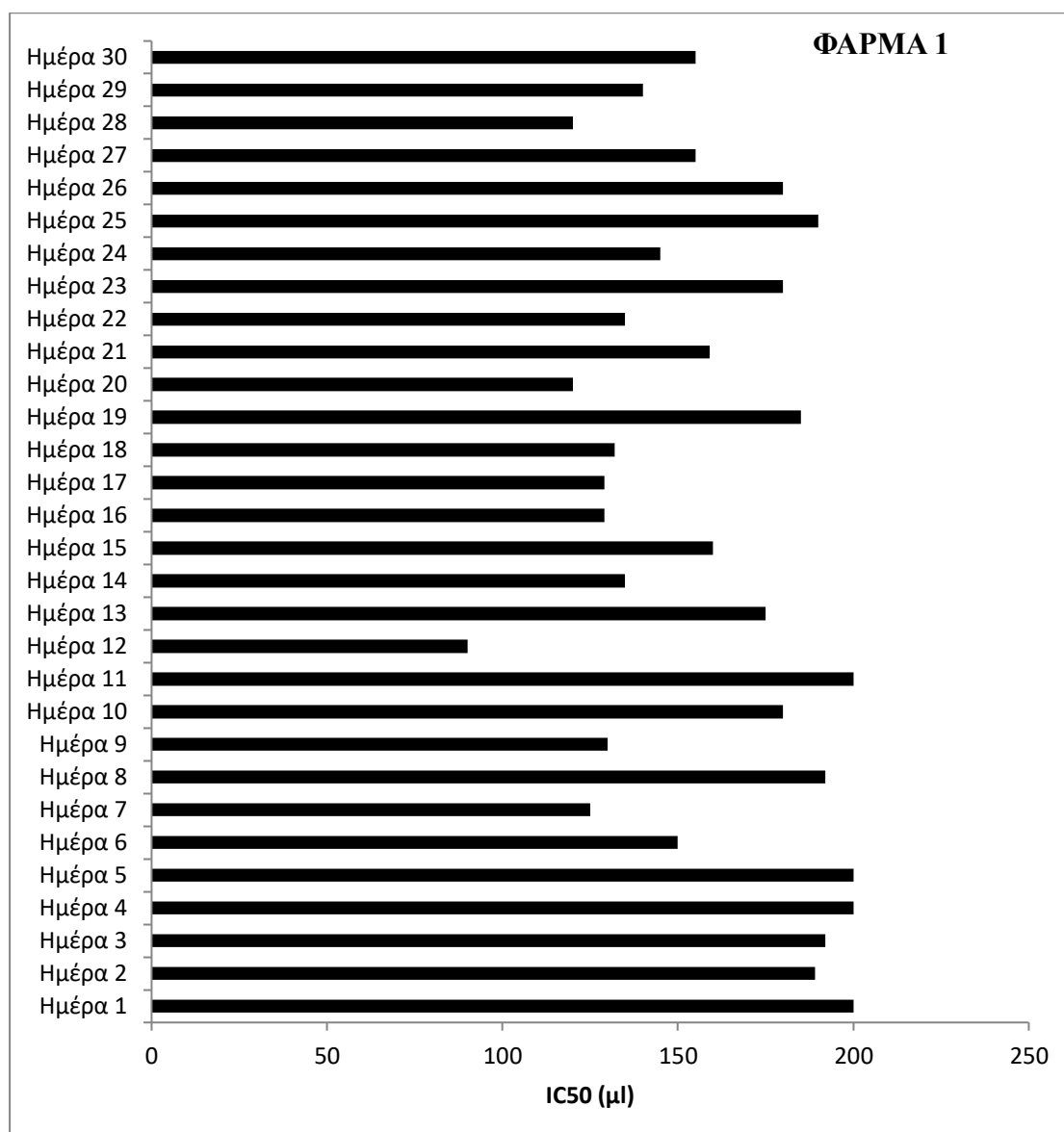
$A_o$ : η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 517 nm

$A_d$ : η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 517 nm

#### 4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

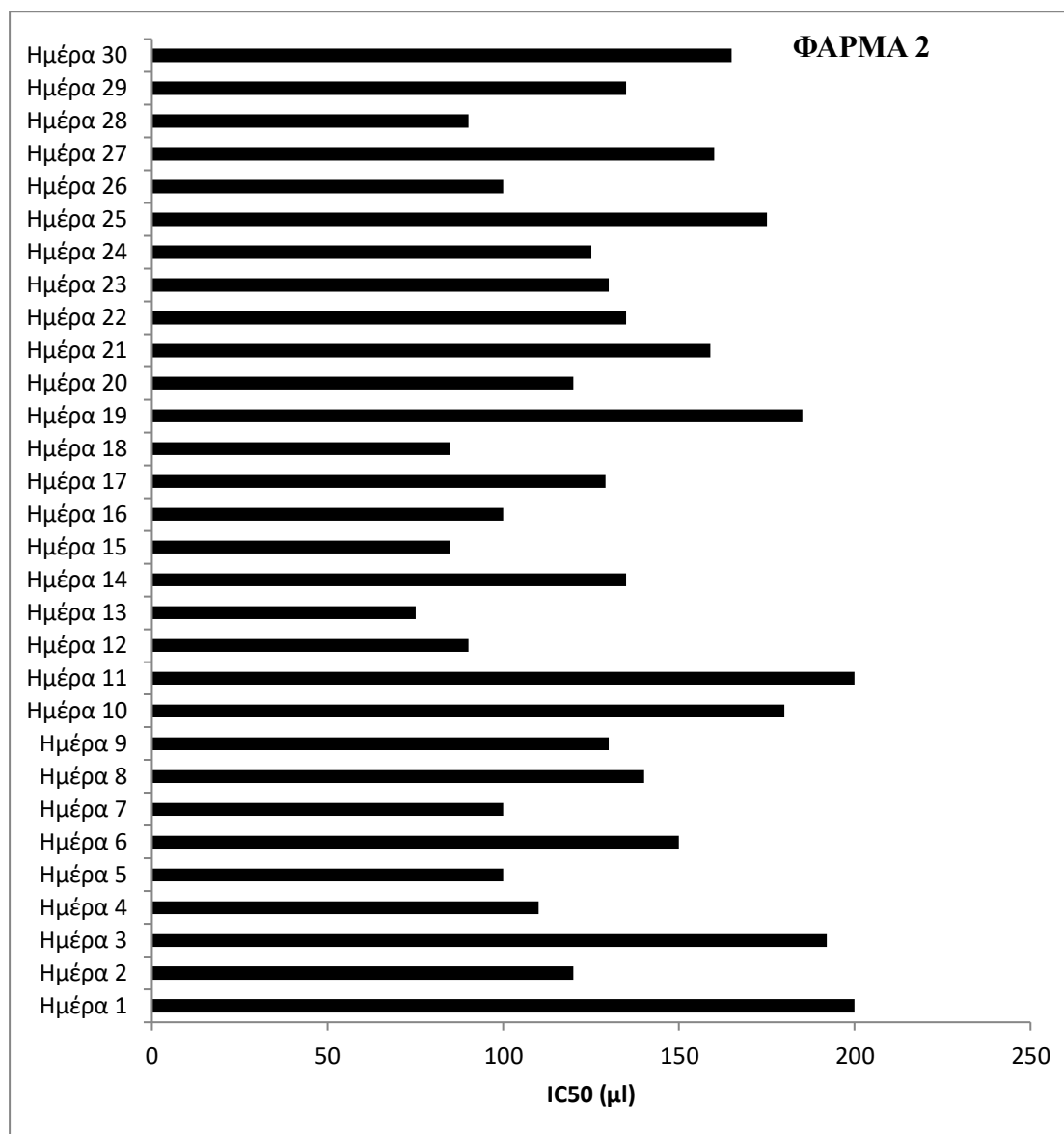
##### Ικανότητα εξουδετέρωσης ρίζας DPPH\*

Το εξεταζόμενο γάλα και των 5 φαρμών εμφάνισε ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα DPPH\*. Για κάθε φάρμα προσδιορίστηκε η τιμή IC<sub>50</sub>, η ποσότητα του γάλακτος που έχει την ικανότητα να αναστέλλει τη ρίζα κατά 50%. Όσο μικρότερη είναι η τιμή IC<sub>50</sub> τόσο μεγαλύτερη είναι και η ικανότητα αναστολής της ρίζας για το εκάστοτε γάλα. Οι τιμές IC<sub>50</sub> για τις φάρμες 1, 2, 3, 4, 5 είναι 158.7 µl, 125.3 µl, 142.8 µl, 104.7 µl και 112.3 µl, αντίστοιχα. Το γάλα της φάρμας 4 εμφάνισε τη μεγαλύτερη ικανότητα εξουδετέρωσης σε σχέση με τις υπολοιπες φάρμες καθώς έχει τη μικρότερη τιμή IC<sub>50</sub> (IC<sub>50</sub>= 104.7 µl).

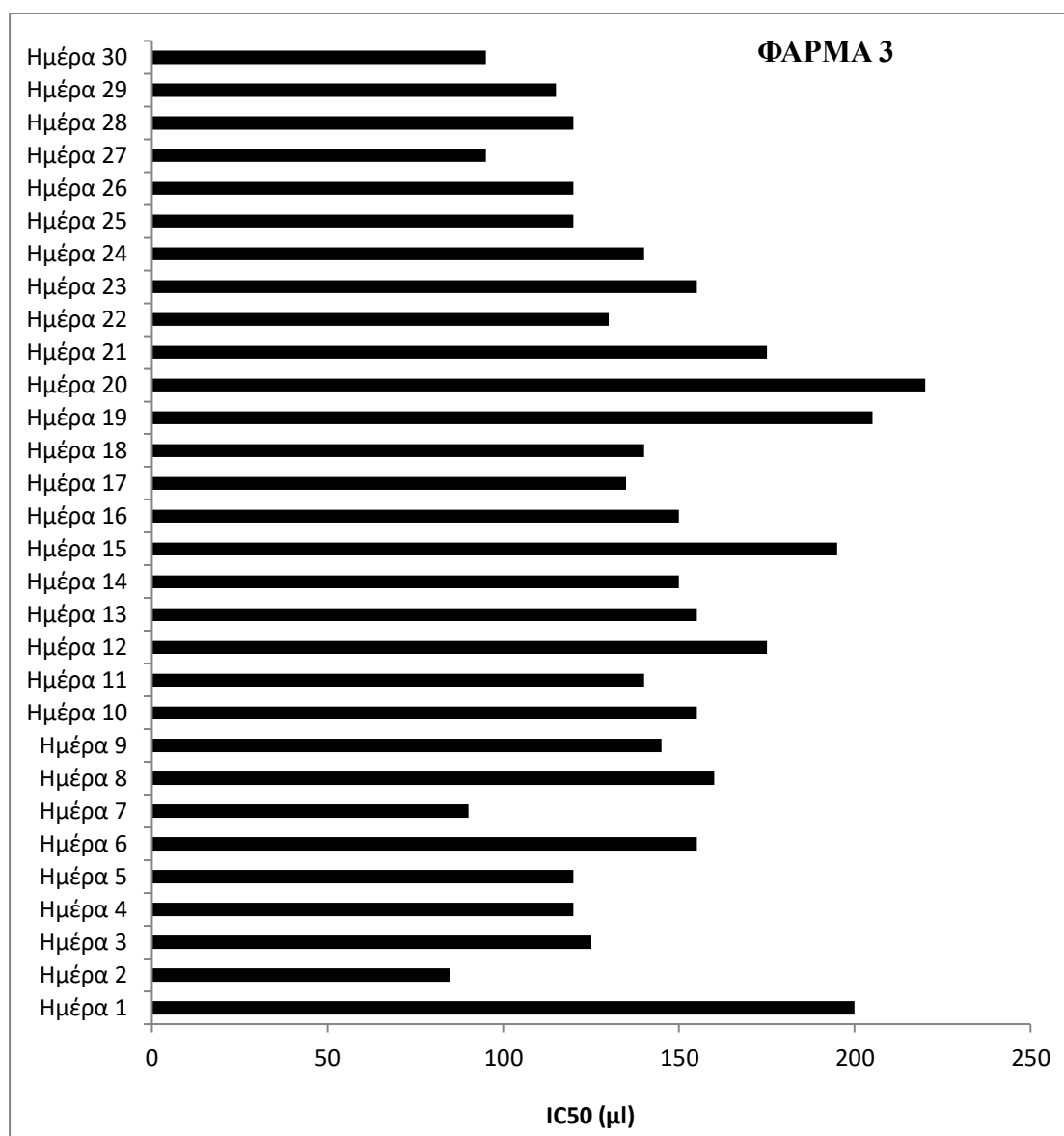




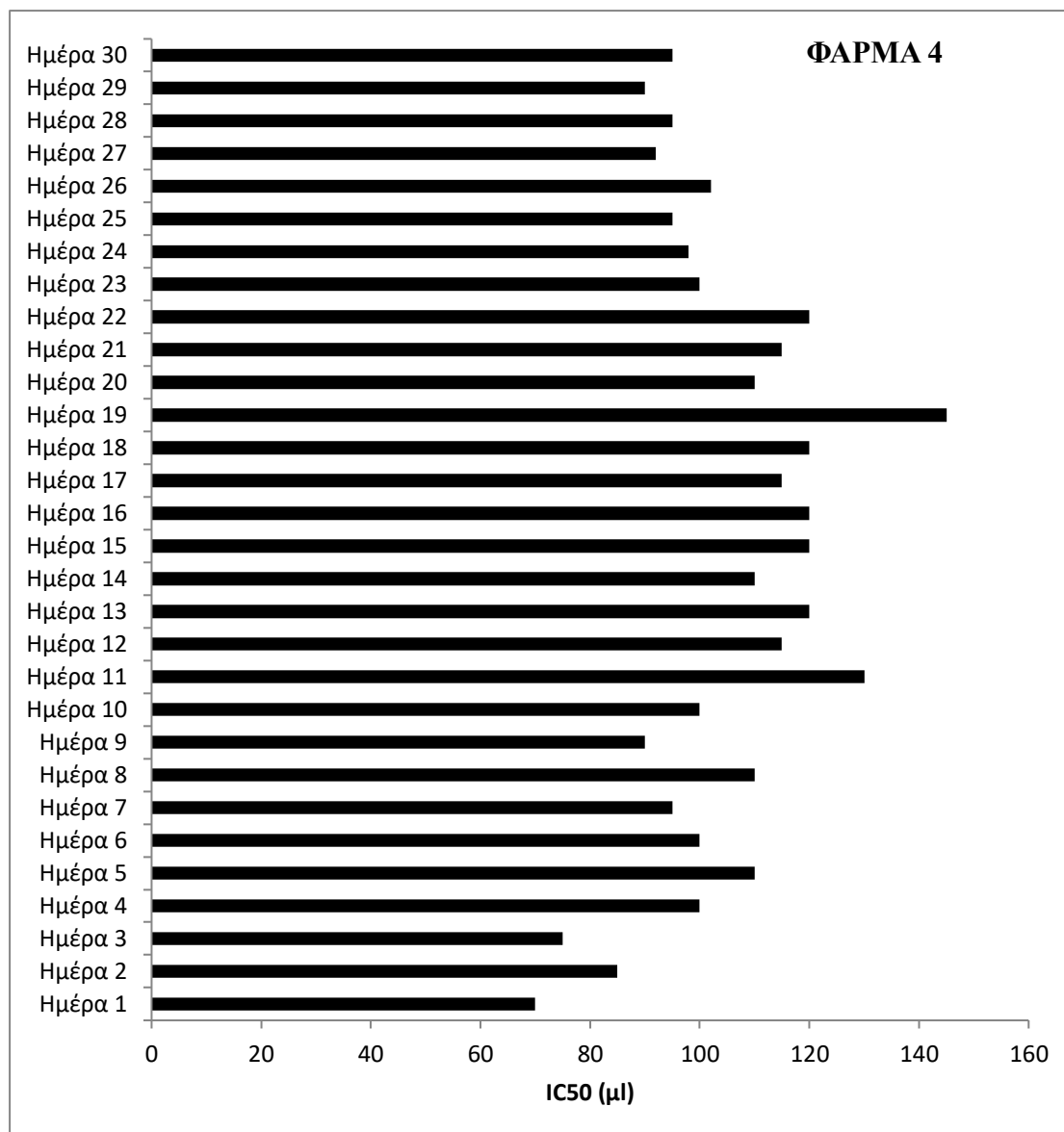
**Γράφημα 1:** Οι τιμές IC50 (μl) για το γάλα της φάρμας 1 όσον αφορά την ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζυλίου (DPPH').



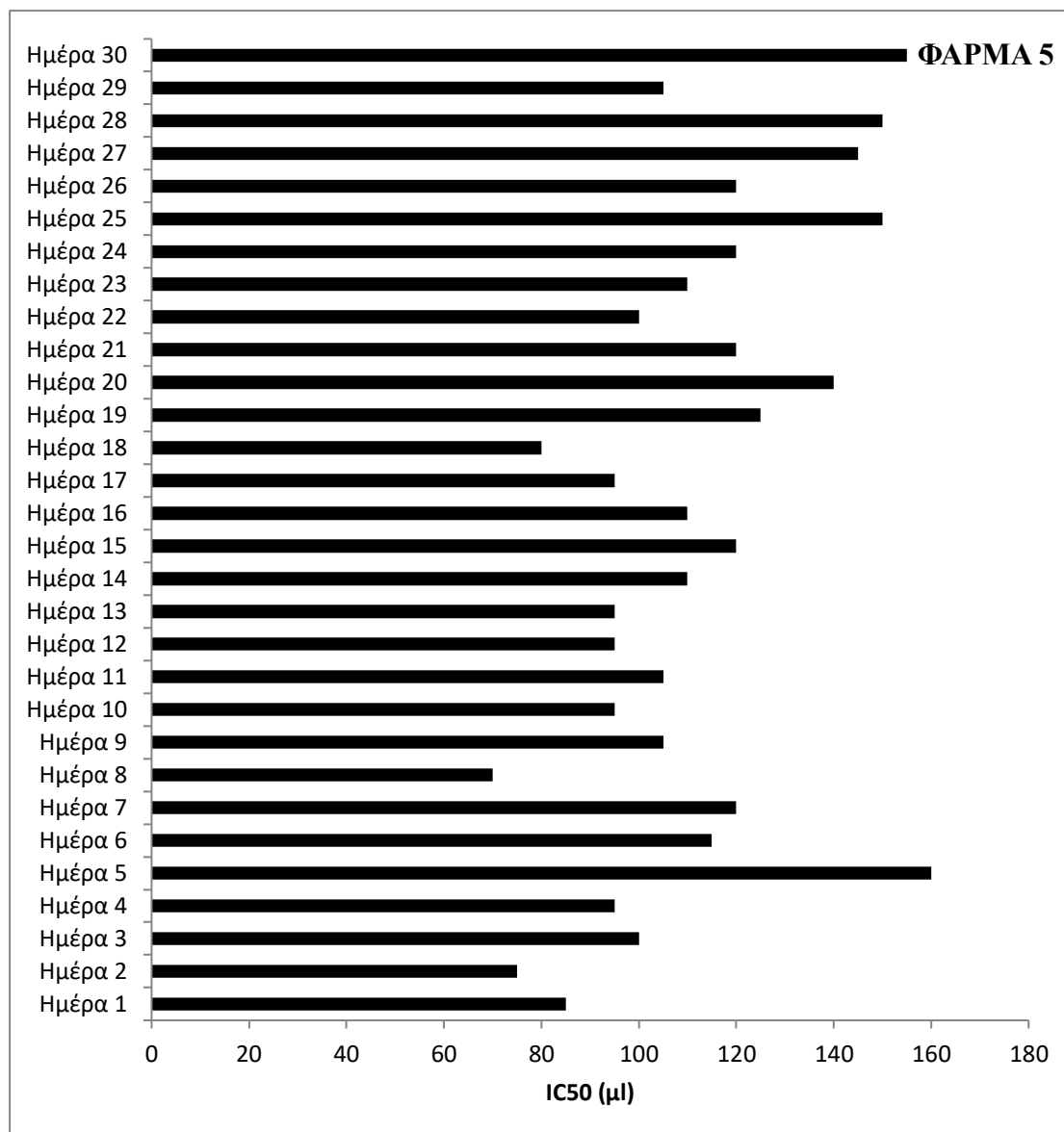
**Γράφημα 2:** Οι τιμές IC50 (μl) για το γάλα της φάρμας 2 όσον αφορά την ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζυλίου (DPPH').



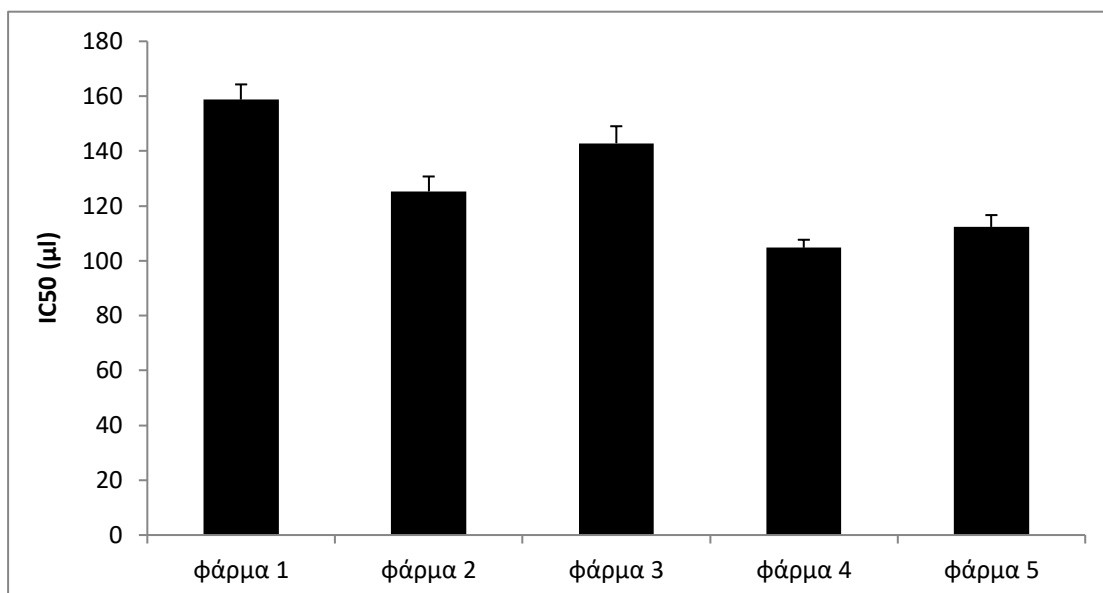
**Γράφημα 3:** Οι τιμές IC50 (μl) για το γάλα της φάρμας 3 όσον αφορά την ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζυλίου (DPPH').



**Γράφημα 4:** Οι τιμές IC50 (μl) για το γάλα της φάρμας 4 όσον αφορά την ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλνδραζυλίου (DRPH').



**Γράφημα 5:** Οι τιμές IC50 (μl) για το γάλα της φάρμας 5 όσον αφορά την ικανότητα εξουδετέρωσης απέναντι στη ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλδραζυλίου (DPPH').



**Γράφημα 6:** Συγκεντρωτικό γράφημα του μέσου όρου των τιμών IC50 για κάθε φάρμα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το γάλα θεωρείται μία από τις βασικές τροφές στο ημερήσιο διαιτολόγιο τόσο των παιδιών, όσο και των ενηλίκων, με το αγελαδινό γάλα να καταναλώνεται σε μεγαλύτερο ποσοστό, συγκριτικά με το κατσικίσιο ή το πρόβειο γάλα, κυρίως λόγω της μεγαλύτερης παραγωγής του, συγκριτικά με τα άλλα δύο. Αποτελεί πολύ καλή πηγή πρωτεϊνών, βιταμινών και μετάλλων, με κυριότερο το ασβέστιο το οποίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό για την υγεία των οστών και των δοντιών. Παρόλο που το αγελαδινό γάλα και ιδιαίτερα το φρέσκο αγελαδινό, είναι το πιο διαδεδομένο, υπάρχουν διάφορα είδη γάλακτος τόσο με βάση την προέλευση τους όσο με βάση τον τρόπο παραγωγής τους ή την περιεκτικότητά τους σε λίπος.

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα παρουσιάζουν επίσης αντιοξειδωτική δράση και θεωρούνται σημαντικά διατροφικά συστατικά που συμβάλλουν στη συνολική πρόσληψη αντιοξειδωτικών. Στο γάλα, οι πρωτεΐνες (και ειδικότερα οι καζεΐνες) είναι οι πιο σημαντικοί εξουδετερωτές ριζών (Clausen et al., 2009). Οι αντιοξειδωτικές ουσίες θεωρούνται σημαντικές για την ανθρώπινη υγεία, χάρη στην ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες και να συμβάλλουν στην πρόληψη χρόνιων ασθενειών όπως καρκίνους, νευροεκφυλιστικές ασθένειες και καρδιακές παθήσεις (Del Rio et al., 2013).

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η αντιοξειδωτική δράση φρέσκου πρόβειου γάλακτος από 5 διαφορετικές φάρμες της περιοχής των Τρικάλων. Το φρέσκο πρόβειο γάλα είναι υψηλής θρεπτικής αξίας, με μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και ασβέστιο σε σχέση με τα υπόλοιπα γάλατα. Συγκεκριμένα, περιέχει σχεδόν τη διπλάσια ποσότητα πρωτεϊνών σε σχέση με το αγελαδινό γάλα (5,98 % και 3,29 % αντίστοιχα), ενώ περιέχει 25% περισσότερο ασβέστιο (193 mg/100 ml). Παράλληλα, είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε φωσφόρο (22.5% ΣΗΠ) αλλά και συζευγμένο λινολεϊκό οξύ (CLA). Ένα ακόμη πλεονέκτημα του πρόβειου γάλακτος είναι ότι πέπτεται πιο εύκολα (λόγω των λιπαρών μέσης αλύσου που περιέχει, τα οποία είναι πιο εύπεπτα) και είναι λιγότερο αλλεργιογόνο συγκριτικά με το αγελαδινό (λόγω του μικρού μεγέθους λιποσφαιρίων του, της κατανομής του λίπους και της λιγότερης λακτόζης που περιέχει).

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι το πρόβειο γάλα και από τις 5 φάρμες εξουδετέρωσε τη ρίζα DPPH. Η ικανότητα εξουδετέρωσης του πρόβειου γάλακτος της ρίζας DPPH πιθανώς οφείλεται στα κύρια αντιοξειδωτικά του, που είναι το συζευγμένο λινολεϊκό οξύ CLA, οι βιταμίνες A και E, το συνένζυμο Q<sub>10</sub> καθώς και οι πρωτεΐνες. Το CLA αποτελεί το πιο ενεργό αντιοξειδωτικό στο λίπος του γάλακτος των μηρυκαστικών με αντιοξειδωτική ικανότητα 100 φορές υψηλότερη της α-τοκοφερόλης (Badr El-Din & Omaye, 2007). Μειώνει τη συγκέντρωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων στις κυτταρικές μεμβράνες με αποτέλεσμα τα κύτταρα των μεμβρανών να είναι λιγότερο ευαίσθητα στην οξείδωση, με αυτόν τον τρόπο μειώνονται οι πιθανότητες να προκληθεί οξειδωτική καταστροφή. Σε μια μελέτη των Fagali & Catala, 2008, βρέθηκε ότι το CLA εμφάνισε ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH. Η βιταμίνη E είναι γνωστή ως ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό το οποίο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις κυτταρικές μεμβράνες καθώς σταματάει τη λιπιδική υπεροξείδωση. Η μοριακή δομή της διευκολύνει την απενεργοποίηση των ROS σε ένα λιπιδικό περιβάλλον (Vasankari et al., 1999; Mastaloudis et al., 2001). Η βιταμίνη A είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη παρούσα σε πολλές λιπιδικές ουσίες. Το β-καροτένιο, παρόν σε κυτταρικές μεμβράνες, μετατρέπεται σε βιταμίνη A όταν ο οργανισμός το χρειάζεται. Αν και ο μηχανισμός της *in vivo* δράσης δεν είναι ξεκάθαρος, το β-καροτένιο απενεργοποιεί τις ROS (ιδιαίτερα το <sup>1</sup>O<sub>2</sub> και λιπιδικές ρίζες) και μειώνει τη λιπιδική υπεροξείδωση (Powers & Lennon, 2000; Ozhogina & Kasaikina, 1995). Τέλος αντιοξειδωτική δράση εμφανίζουν και οι πρωτεΐνες του γάλακτος, τόσο οι καζεΐνες όσο και οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος. Με την υδρόλυση των καζεϊνών προκύπτουν τα αμινοξέα ιστιδίνη, λυσίνη, προλίνη και τυροσίνη τα οποία εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες (Power et al. 2013). Αλληλουχίες καζεϊνών μοριακού βάρους 3 kDa απενεργοποιούν τη ρίζα DPPH αναλογικά με το επίπεδο συγκέντρωσής τους στο περιβάλλον αντίδρασης (Sakanaka et al. 2005). Η πρωτεΐνη τυρογάλακτος εμφανίζει ισχυρή αντιοξειδωτική δράση πιθανώς με τη συνεισφορά της σε πρωτεΐνες πλούσιες σε κυστεΐνη, οι οποίες βοηθούν τη σύνθεση της γλουταθειόνης (GSH), ενός από τα σημαντικότερα ενδοκυτταρικά αντιοξειδωτικά (Walzem et al., 2002). Η GSH είναι το πιο σημαντικό αντιοξειδωτικό στον οργανισμό, παρέχει προστασία ενάντια σε ηλεκτρονιόφιλα, αλογονωμένες δομές και εποξειδία και εμπλέκεται σε πολλούς άμεσους και έμμεσους προστατευτικούς μηχανισμούς (Masella et al., 2005). Σε προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου μας βρέθηκε ότι η αιγοπρόβεια πρωτεΐνη τυρογάλακτος εμφανίζει ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH (Kerasioti et al., 2014).

Ακόμη, από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης παρατηρήθηκε ότι το γάλα της φάρμας 4 εμφάνισε τη μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα καθώς στο σύνολο των 30 ημερών εμφάνισε τη μικρότερη τιμή IC50 (Γράφημα 6). Αυτό το αποτέλεσμα πιθανώς οφείλεται στη διαφορετική διατροφή των ζώων. Στα ζώα της φάρμας 4 εφαρμόστηκε ελεύθερη βόσκηση σε σχέση με τις υπόλοιπες φάρμες 1, 2, 5 όπου εφαρμόζεται αποκλειστικός ενσταβλισμός και τη φάρμα 3 όπου εφαρμόστηκε μικτή εκτροφή με βόσκηση και ενσταβλισμό. Τα τελευταία 20 χρόνια παρατηρείται αυξημένο ενδιαφέρον για τη μελέτη της επίδρασης της διατροφής των ζώων, τόσο στη σύσταση, όσο και στην περιεκτικότητα σε βιταμίνες και φυσικά αντιοξειδωτικά του λίπους των προϊόντων, που αυτά παράγουν (κρέας, γάλα). Συγκεκριμένα, η αυξημένη πρόσληψη κορεσμένων λιπών, π.χ. λαυρικό, μυριστικό, παλμιτικό, συνδέεται άμεσα με αυξημένο κίνδυνο για την ανάπτυξη καρδιαγγειακών νοσημάτων. Αντίθετα, η πρόσληψη μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, όπως το ελαϊκό και πολυακόρεστων, όπως τα ω-6 λινολεϊκό και συζευγμένο λινολεϊκό ή τα ω-3 α-λινολενικό, δοκοσαπεντανοϊκό (DPA) και δοκοσαεξανοϊκό (DHA) έχουν συνδεθεί με προστατευτικές δράσεις για την υγεία του ανθρώπου. Το λίπος στο γάλα και στο κρέας των αιγοπροβάτων περιέχει φυσιολογικά υψηλές συγκεντρώσεις των ανεπιθύμητων κορεσμένων λιπών, αλλά οι τιμές αυτές, όπως επίσης και γενικότερα το προφίλ των λιπαρών οξέων, επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες και κυρίως από τη διατροφή των ζώων. Έχουν παρατηρηθεί αυξημένες συγκεντρώσεις σε λινολεϊκό, α-λινολενικό και συζευγμένο λινολεϊκό οξύ στο κρέας και στο γάλα ζώων, των οποίων η διατροφή περιελάμβανε βόσκηση σε φυσικούς ή καλλιεργήσιμους λειμώνες σε σύγκριση με περιπτώσεις, όπου αντίστοιχα τα ζώα διατρέφονταν κυρίως με συμπληρωματικές συμπυκνωμένες ζωοτροφές. Η μεταβολή αυτή στο προφίλ των λιπαρών οξέων συνδέεται με το υψηλό ποσοστό των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που υπάρχουν στα φυτά. Παρόμοιες μεταβολές στο προφίλ των λιπαρών οξέων έχουν επίσης παρατηρηθεί σε ζώα μετά από αλλαγή στο πρόγραμμα διατροφής τους, και συγκεκριμένα όταν μειώθηκε η χορήγηση συμπληρωματικής ζωοτροφής και σανού και αυξήθηκε το χρονικό διάστημα βόσκησης. Τα μεγαλύτερα οφέλη παρατηρήθηκαν, όταν τα ζώα έβοσκαν φρέσκα χόρτα, που βρίσκονταν στα πρώτα στάδια ανάπτυξης, σε σύγκριση με χόρτα που είχαν ανθίσει ή τα κατανάλωναν με μορφή σανού. Πέραν όμως των αλλαγών που μπορεί να έχει στη σύσταση του λίπους, η βόσκηση θεωρείται ότι μπορεί να αυξήσει και τη συγκέντρωση στο γάλα και στο κρέας και άλλων επιθυμητών μικροθρεπτικών



συστατικών. Η βιταμίνη Α, τα καροτενοειδή και οι τοκοφερόλες, αποτελούν ουσίες των οποίων η συγκέντρωση θεωρείται ότι επηρεάζεται θετικά από τη βόσκηση.

Η βόσκηση λοιπόν, αποτελεί βασική παράμετρο στην εκτροφή των προβάτων, καθώς καλύπτει μεγάλο μέρος της διατροφής τους και προσδίδει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και υψηλή ποιότητα στα παραγόμενα προϊόντα.

## 6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Al – Abbad, F.A.; Al-Sowielem , L. S., Prevalence of obesity .Saudi Med. J., 1998, 19(5),608

Albenzio M., Santillo A,Avondo M.,Nudda A,Chessa S, Pirisi A, Banni S.2016.Nutritional properties of small ruminant food products and their role on human health.Small Ruminant Res 135:3-12

Ali Y M ,Kadir A A, Ahmad Z,Yaakub H,Zakaria Z A and Hakim Abdullah M N (2012) Free radical scavenging activity of conjugated linoleic acid as single or mixed isomers.Pharmaceutical Biology 50 712-719

Alichanidis E.; Polychroniadou, A., Special features of dairy products from ewe and goat milk from the physicochemical and organoleptic point of view. In: Production and Utilization of Ewe and Goat. Milk ,1996, 9603,21-43

Ames ,B.N.,Shigenaga,M.K.,&Hagen, T.M. (1993).Oxidants,antioxidants and the degenerative diseases of aging.Proceedings of the *National Academy of Sciences of the United States of America*,90(17)7915-22

Amigo, L., Recio, I., Ramos,M.,2000.Genetic polymorphism of ovine milk proteins:its influence on technological properties of milk – a review.Int.Dairy J. 10, 135-149

Aruoma, O.I., Halliwell,B., Laughton, M.J., Quinlan,G.j., & Gutteridge, J.M.(1989).The mechanism of initiation of lipid peroxidation.Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex.*The Biochemical Journal*,258,617-20

Barlowska J, Szwajkowska M,L Twinczuk Z, Krol J.2011.Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production.Compr Rev Food Safety 10:291-302

Bhattacharya A, Banu J,Rahman M,Causey J and Fernandez G (2006) Biological effects of conjugated linoleic acids in health and Disease.Journal of Nutritional Biochemistry 17 789-810

Bell, K., McKenzie, H.A., 1967.The whey proteins of ovine milk:β-lactoglobuline A and B.*Biochem.Biophys.Acta* 147,123-124

Brand M.D.;Buckingham A.J.;Esteves T.C., Mitochondrial superoxide and ageing: uncoupling protein activity and superoxide production. *Biochem. Soc. Symp.*, 2004, 71 ,203

Brooks SE.Ultrastructure of voluntary muscle in childhood malnutrition.*West Indian Med J* 1995;44:133

Buettner GR (1993) The pecking order of free radicals and antioxidants :lipid peroxidation ,α-tocopherol,and ascorbate.*Archives of Biochemistry and Biophysics* 300,535-543

Cencic A, Chingwaru W. 2010. The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health. *Nutrients* 2:611-25

Chianese, L., 1997. The casein variants of ovine milk and the relationships between the  $\alpha$ s1 casein variants and milk composition, micellar size and cheese yield. Casein and Caseinates: Structures, Interactions, Networks. Hannach Symposium, Scotland, UK.

Clausen MR, Skibsted LH, Stagsted J (2009) Characterization of major radical scavenger species in bovine milk through size exclusion chromatography and functional assays. *J Agric Food Chem* 57:2912–2919

Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, vol. 16, 2017

Davoodi H, Esmaeili S and Mortazavian A M (2013) Effects of milk and milk products consumption on cancer: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12 249-264

Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G, Crozier A (2013) Dietary (poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal* 18:1818–1892

Dempster WS, Sive AA, Rosseau S, Malan H, Heese HV. Misplaced iron in Kwashiorkor. *Eur J Clin Nutr* 1995 ;49:208

Duarte T L and Lunec J (2005) Review: When is an antioxidant not an Antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radical Research* 39 671-686

Fagali N1, Catalá A. Antioxidant activity of conjugated linoleic acid isomers, linoleic acid and its methyl ester determined by photoemission and DPPH techniques. *Biophys Chem*. 2008 Sep;137(1):56-62. doi: 10.1016/j.bpc.2008.07.001. Epub 2008 Jul 6.

Fang Y Z, Yang S and Wu G (2002) Free Radical, Antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18 872-879

Fontecha, J., Goudjil, H., Rios, J.J., Fraga, M.J., Juarez, M., 2005. Identity of the major triacylglycerols in ovine milk fat. *Int. Dairy J.* 15, 1217-1224

Fehily AM, Yarnell JW, Sweetnam PM, Elwood PC: Diet and incident ischaemic heart disease: The Caerphilly Study. *British Journal of Nutrition* 1993, 69:303-14

Fridovich I (1974) Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology* 41, 35-97

Fridovich I (1986) Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology* 58, 61-97

Gaucheron F (2011) Milk and dairy products: A unique micronutrient composition. *Journal of the American College of Nutrition* 30 400S-409S

Gilbert DL 1981, Oxygen and living processes: an interdisciplinary approach, Springer, NY

Goudjil, H., Fontecha, J., Luna, P., Fuente de la, M.A., Alonso, L., Juarez, M., 2004. Quantitative characterization of unsaturated and trans fatty acids in ewe's milk fat. *Lait* 84, 473-482

Gutteridge JMC & Halliwell B (1994) Antioxidants in nutrition, Health and Disease. Oxford: Oxford University Press

Gutteridge JMC, Paterson SK, Segal AW & Halliwell B (1981) Inhibition of lipid peroxidation by the iron-binding protein lactoferrin. *Biochemical Journal* 56, 2079-2080

Haenlein, G.F.W., 2001. The nutritional value of sheep milk. *Int. J. Animal Sci.* 16, 253-268

Haenlein GFW. 2001. Past, present and future perspectives of small ruminant dairy research. *J Dairy Sci* 84: 2097-115

Halliwell B, Gutteridge JMC, (eds), Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University Press, Oxford, 1997

Halliwell, B., & Gutteridge, J.M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1-85

Jahreis, G., Fritsche, J., Kraft, J., 1999. Species dependent, seasonal and dietary variation of conjugated linoleic acid in milk. In: Yurawecz, M.P., Mossoba, M.M., Kramer, J.K.G., Pariza, M.W., Nelson, G.J. (Eds.), *Advances in Conjugated Linoleic Acid*. American oil Chemists Society, Champaign, IL.

Kaliora A C, Dedoussis G V Z and Schmidt H (2006) Dietary Antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis* 187 1-17

Kerasioti, E., Stagos, D., Priftis, A., Aivazidis, S., Tsatsakis, A.M., Hayes, A.W., Kouretas, D., 2014. Antioxidant effects of whey protein on muscle C2C12 cells. *Food Chem.* 155, 271-278.

Lee, K.W., Lee, H.J., Cho, H.Y., Kim, Y.J., 2005b. Role of the conjugated linoleic acid in the prevention of cancer. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 45, 135-144

Lindmark –Mansson H.; Akesson B. Antioxidative factors in milk. *Brit. J. Nutr.*, 2000, Suppl. 1, 103-110

Lipinski B. Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2001; 15: 203-10

Lopez – Exposito, I., Gomez-Ruiz, J.A., Amigo, L., Recio, I., 2006. Identification of antibacterial peptides from ovine  $\alpha$ 2-casein. *Int Dairy J.* 16, 1072-1080

Lopez – Tinoco C.; Roca M.; Garcia-Valero A.; Murri M.; Tinahones F.J. Oxidative stress and antioxidant status in patients with late-onset gestational diabetes mellitus. *Acta Diabetol.*, 2011

Mann, E.J.,1988.Ewe's and goat's milk and products. 1. *Dairy Ind. Int.* 53,23

Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., Giovannini, C. 2005. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem.* 16:577–586.

Ness AR,Smith GD,Hart C :Milk,coronary heart disease and mortality.J Epidimiol Community Health 2000,55:379-82

Nicholson ZWG & St-Laurent A-M (1991) Effect of forage type and supplemental dietary vitamin E on milk oxidative stability.*Canadian Journal of Animal Science* 71, 135-143

Pastore, A., Federici, G., Bertini, E., & Piemonte, F.(2003).Analysis of glutathione:implication in redox and detoxification.*Clinica Chimica Acta;International Journal of Clinical Chemistry*, 333,19-39

Pariza, M.W.,2004.Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid.*Am.J.Clin.Nutr.*79(Suppl), 1132S-1136S.

Park Y W,Juarez M,Ramos M,Haenlein GFW.2007.Physicochemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminants Res* 68:88-113

Pryor W.A., The antioxidant nutrients and disease prevention – What do we know and what do we need to find out? *Am. J. Clin. Nutr.*, 1991,53, S391-S393

Saxelin M, Korpela R, Mayra – Makinen A: Introduction:Classifying functional dairy products. In *Functional dairy products* Edited by:Mattila – Sandholm T, Saarela M. Woodhead Publishing Limited UK;2003:1-16

Schneider C (2005) Chemistry and Biology of vitamin E.Molecular Nutrition and Food Research 49 7-30

Sies H. (ed) *Antioxidants in Disease ,Mechanisms and Therapy*,Academia Press,New York,1996

Stadtman ER.Protein foundation and aging.Science 1992;257:1220-25

Walzem, R.L., Dillard, C.J., German, J.B. (2002). Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 42, 353-375.

Wendorff WL.2001.Freezing qualities of raw ovine milk for further processing. *J Dairy Sci* 84:E74-8

Wu G, Meininger CJ .Regulation of nitric oxide synthesis by dietary factors. *Annu Rev Nutr* 2002;22:61

Y.W.Park, M.Juarez, M. Ramos,G.F.W Haenlein,*Small Ruminant Research* 68(2007)88-113

Βελτίωση και Διαχείριση Φυσικών Βοσκοτόπων, Δρ. Γεώργιος Π.Σαρλής, Μέρος Α & Β ,Εκδόσεις Σταμούλη,Αθήνα 1998

Διατροφή Αγροτικών Ζώων ,Γ. Ζέρβα ., Π.Καλαϊσάκη., Κ.Φεγγερού,Εκδόσεις Αθαν.Σταμούλη, Αθήνα 2000.